



# **Effekte unterschiedlicher Expressionsstrategien auf die Lipidmodifikation von rekombinantem OspA in Tabak**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Anna Carina Hennig

aus Würzburg

Berichterstatter: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung am 25.02.2011

Tag der mündlichen Prüfung am 06.05.2011

Darmstadt 2011

D 17

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2006 bis September 2007 in der Arbeitsgruppe von Dr. Heribert Warzecha am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg begonnen und im Zeitraum September 2007 bis Juni 2010 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heribert Warzecha am Fachbereich Biologie der TU Darmstadt fortgesetzt.

*Für meine Familie*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Lipoproteine</b>	<b>10</b>
1.1.1 Lipidierung in eukaryotischen Zellen	10
1.1.2 Lipidierung in prokaryotischen Zellen	13
<b>1.2 Lyme-Borreliose und OspA</b>	<b>18</b>
1.2.1 Outer surface protein A (OspA)	19
1.2.2 OspA als Vakzin	20
1.2.3 Rekombinantes plastidäres OspA (rpOspA)	21
<b>1.3 Synthese rekombinanter Proteine in Pflanzen</b>	<b>22</b>
1.3.1 Stabile Chloroplastentransformation	23
1.3.2 Transiente Expression	27
<b>1.4 Einfluss von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen auf Expressionsrate und Proteinakkumulation rekombinanter Proteine</b>	<b>30</b>
<b>1.5 Fragestellung</b>	<b>32</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Nährmedien</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Genmaterial, Plasmide und Proteine</b>	<b>42</b>
<b>2.4 Bakterien</b>	<b>46</b>
<b>2.5 Pflanzen</b>	<b>47</b>
<b>2.6 Methoden</b>	<b>48</b>
<b>2.6.1 Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material</b>	<b>48</b>
2.6.1.1 Steriles Ausbringen von Samen	48
2.6.1.2 Kultivierung von Pflanzen	48
2.6.1.3 Pfropfen von Tabak auf Tomatensprosse	48
<b>2.6.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>49</b>
2.6.2.1 Restriktionsverdau	49
2.6.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	50
2.6.2.3 DNA-Ligation	50



2.6.2.4 Transformation von Bakterienzellen	51
2.6.2.5 PCR-Colony-Screen	51
2.6.2.6 Amplifikation von Nukleotidsequenzen	52
2.6.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA	54
2.6.2.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	54
2.6.2.9 Langfristige Kultivierung von Bakterien	55
2.6.2.10 Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	55
2.6.2.11 Herstellung kompetenter Agrobakterien	56
2.6.2.12 Sequenzierung von DNA	56
<b>2.6.3 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>56</b>
2.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.6.3.2 Probenvorbereitung und Elektrophorese	57
2.6.3.3 Proteinfärbung mittels Silbernitrat	58
2.6.3.4 Immunoblot	59
2.6.3.5 Herstellung von Extrakten des löslichen Gesamtproteins	60
2.6.3.6 Reinigung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial	60
2.6.3.7 Proteinquantifizierung mittels BCA Protein Assay	61
2.6.3.8 2D-Gelelektrophorese	61
2.6.3.9 Image-Analyse von 2D-Gelen	63
2.6.3.10 Probenvorbereitung zur LC-MS/MS-Analyse	64
2.6.3.11 LC-MS/MS-Analyse	64
<b>2.6.4 Methoden zur Transformation von Tabakpflanzen</b>	<b>65</b>
2.6.4.1 Stabile Chloroplastentransformation mittels Genegun	65
2.6.4.2 Transiente Expression mittels Agrobakterien	67
<b>2.6.5 Methoden zur Identifizierung transgener Pflanzen</b>	<b>67</b>
2.6.5.1 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial	67
2.6.5.2 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial	68
2.6.5.3 Denaturierende Agarosegele	68
2.6.5.4 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	69
2.6.5.5 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP-Analyse)	69
2.6.5.6 RNA-Blot	70
2.6.5.7 Hybridisierung mit DIG-dUTP markierten Sonden	71
<b>2.6.6 Methoden zur Charakterisierung transgener Pflanzen</b>	<b>72</b>
2.6.6.1 Isolierung von Thylakoidmembranen	72
2.6.6.2 Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten	72
2.6.6.3. <i>In vivo</i> -Inkorporation von [9,10- <sup>3</sup> H] Palmitinsäure	73
2.6.6.4 Analyse des Gehalts löslicher Zucker	74
2.6.6.5 Messung der Chlorophyllfluoreszenz mittels PAM-Fluorometer	75

2.6.6.6 Mikroskopische Bildgebung am CLSM	76
2.6.6.7 Bestimmung des Nikotingehalts mittels GC-MS-Analyse	76
<b>2.6.7 Methoden der immunologischen Untersuchungen</b>	<b>77</b>
2.6.7.1 Herstellung von Blattextrakten	77
2.6.7.2 Immunologische Untersuchungen an Mäusen	78
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>79</b>
<b>3.1 Transplastome Pflanzen</b>	<b>79</b>
<b>3.1.1 Expression von rpOspA: Untersuchung des Einflusses variabler Signalsequenzen auf Lipidierung und Proteinakkumulation</b>	<b>79</b>
3.1.1.1 Proteinakkumulation	83
3.1.1.2 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung	84
3.1.1.3 Pflanzenvitalität und endogener Zuckergehalt	86
3.1.1.4 Messung der Chlorophyllfluoreszenz	90
3.1.1.5 2D-Gel-Analyse	92
3.1.1.6 Thylakoidisolierung	96
<b>3.1.2 Verwendung alternativer Signalsequenzen als Lipidierungsmotiv</b>	<b>98</b>
3.1.2.1 Klonierung der Lipobox-Konstrukte	99
3.1.2.2 Stabile Chloroplastentransformation	101
3.1.2.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen	102
3.1.2.4 Proteinakkumulation und Transgenexpression	105
<b>3.1.3 Ermittlung eines minimalen Lipidierungsmotivs mit dem Reportergen-System</b>	<b>107</b>
3.1.3.1 Klonierung einer OspA:YFP-Fusion	109
3.1.3.2 Stabile Chloroplastentransformation	111
3.1.3.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen	111
3.1.3.4 Charakterisierung des Phänotyps	112
3.1.3.5 Nachweis der Proteinsynthese	113
3.1.3.6 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung	115
3.1.3.7 Visuelle Lokalisation der Reporterproteine mittels CLSM	116
3.1.3.8 Thylakoidisolierung	117
<b>3.2 Transiente Expression</b>	<b>119</b>
<b>3.2.1 Transiente Expression von rekombinantem OspA</b>	<b>119</b>
3.2.1.1 Klonierung der OspA-Konstrukte für die transiente Expression	120
3.2.1.2 Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis von rekombinantem OspA	122
3.2.1.3 Proteinakkumulation nach transienter Expression	124
<b>3.2.2 Transiente Expression der Reportergen-Konstrukte</b>	<b>125</b>
3.2.2.1 Infiltration und Proteinsynthese der Reportergen-Konstrukte	126

3.2.2.2 Lokalisation des Reporterproteins nach transienter Expression	128
3.2.2.3 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung	131
<b>3.3 Immunogenität von transgenem OspA-Pflanzenmaterial</b>	<b>133</b>
3.3.1 Pfropfung von transplastomen Tabakpflanzen und Bestimmung des endogenen Nikotingehalts	133
3.3.2 Fütterungsversuche an Mäusen	136
<b>4. Diskussion</b>	<b>142</b>
<b>4.1 Untersuchungen zur Lipidmodifikation in transplastomen Pflanzen</b>	<b>142</b>
4.1.1 Lipidierung und Lokalisation von plastidärem OspA	142
4.1.2 Eine erhöhte Proteinakkumulation von rpOspA nimmt Einfluss auf die Vitalität transplastomer Pflanzen	146
4.1.3 Ermittlung eines minimalen Lipidierungsmotivs mithilfe des Reporter-gen-Systems	150
4.1.4 Bakterielle Signalsequenzen haben negativen Einfluss auf die Akkumulationsrate rekombinanter plastidärer Proteine	151
4.1.5 Untersuchung endogener Lipidierungssequenzen	154
<b>4.2 Transiente Expression</b>	<b>155</b>
4.2.1 Einfluss N-terminaler Signalsequenzen auf die transiente Expression	156
4.2.2 Untersuchung zur Lipidierung nach transienter Expression	159
<b>4.3 Immunogenität von OspA-Pflanzenmaterial</b>	<b>162</b>
<b>4.4 Fazit: Bedeutung bakterieller Signalsequenzen für die Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen</b>	<b>166</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>168</b>
<b>6. Summary</b>	<b>170</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>191</b>
<b>Danksagung</b>	<b>198</b>
<b>Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden</b>	<b>199</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>200</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>201</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<i>aadA</i>	Aminoglycosid-3''-Adenyltransferase-Gen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>atpI</i>	Gen der H <sup>+</sup> -ATPase Untereinheit IV
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
dd H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DIG-dUTP	Digoxigenin-Desoxyuridintriphosphat
DREPP	Developmentally Regulated Plasma Membrane Polypeptides
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F'	Minimale Fluoreszenz eines lichtadaptierten Blattes
F <sub>O</sub>	Minimale Fluoreszenz eines dunkel adaptierten Blattes
F <sub>M</sub>	Maximale Fluoreszenz eines dunkel adaptierten Blattes
F <sub>M</sub> '	Maximale Fluoreszenz eines lichtadaptierten Blattes
F <sub>V</sub>	Variable Fluoreszenz
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	Maximale Quantenausbeute
FG	Frischgewicht
GC	Gas Chromatography
GC-MS	GC gekoppelte Massenspektrometrie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G

IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC-MS/MS	HPLC gekoppelte Tandemmassenspektrometrie
LGP	Lösliches Gesamtprotein
Lgt	Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglycerin-Transferase
Lnt	Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase
Lsp	Signalpeptidase II
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
MKS	Multiple Klonierungsstelle
M <sub>R</sub>	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
MS-Salze	Murashige & Skoog Salze
NAA	1-Naphtylelessigsäure
<i>nos</i>	Gen der Nopalinsynthase
<i>npII</i>	Neomycinphosphotransferase II-Gen
OD	Optische Dichte
OspA (OA)	Outer surface protein A
OT	OspA truncated
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PAM-Fluorometer	Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PAP	Plasmid lipidassoziiertes Protein
PAT	Protein-Acyltransferase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction

PEG	Polyethylenglycol
pi	post infection
PPFD	Photosynthetisch aktive Photonenflux-Dichte
<i>Prrn</i>	16srRNA Promoter
PS II	Photosystem II
<i>psaB</i>	Gen des P700 Chlorophyll a Apoproteins A2 (PS I)
<i>psbA</i>	Gen des D1-Proteins von PS II
<i>psbB</i>	Gen des CP47 Proteins von PS II
<i>psbC</i>	Gen des CP43 Proteins von PS II
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rbOspA	Rekombinantes bakterielles OspA
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rpOspA	Rekombinantes plastidäres OspA
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Trockenextrakt
TG	Trockengewicht
TLR	Toll-like Rezeptoren
U	Spannung
<i>uidA</i>	β-Glucuronidase-Gen
UTR	Untranslatierte Region
V	Volumen
Vhrs	Voltstunden
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
Y (II)	effektive Quantenausbeute von PS II

## 1. Einleitung

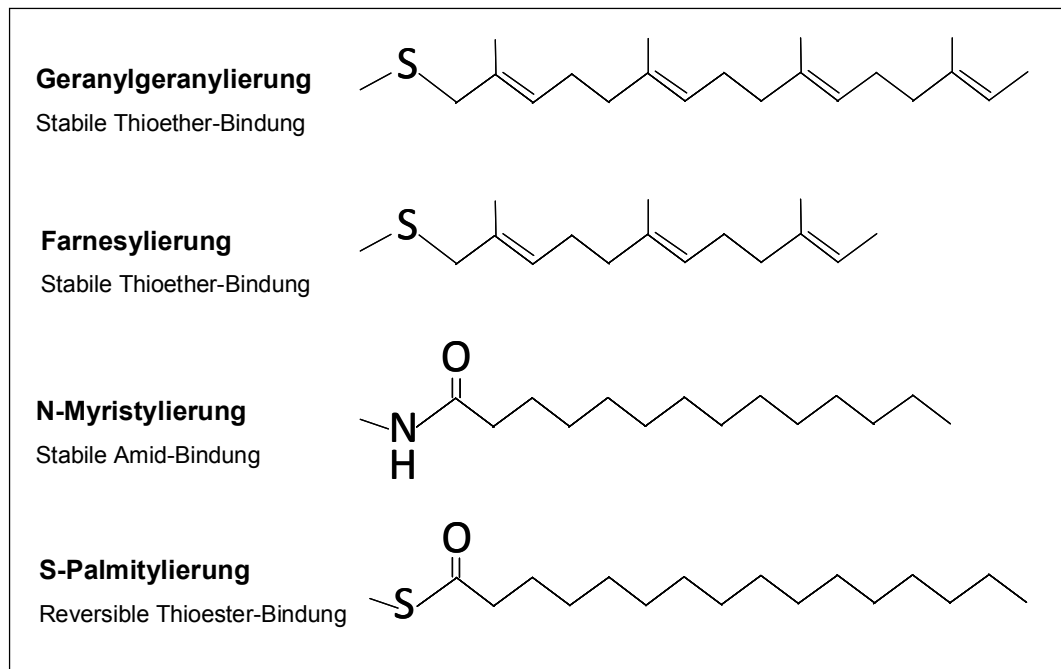
### 1.1 Lipoproteine

Die Anheftung variabler Fettsäuren an Peptide stellt neben der Glykosylierung, Phosphorylierung und proteolytischen Spaltung eine Modifikation dar, die ubiquitär in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen vorkommt. Während die proteolytische Spaltung, der alle zellulären Proteine unterworfen sind, vor allem bei zielgerichteten Transportprozessen zu finden ist, übt die Modifikation mit heterogenen Substanzen wie Phosphatgruppen, Kohlenhydraten oder Fettsäuren erheblichen Einfluss auf Eigenschaften und Funktionen eines Proteins aus (Wold, 1981). Die Modifikation mit Fettsäuren bedingt in jedem Fall die Affinität des Proteins zu hydrophoben oder lipophilen Zellkompartimenten, so dass Lipoproteine in erster Linie Membranproteine darstellen. Beispiele dafür sind das Braun'sche Lipoprotein aus *E. coli* (Braun & Rehn, 1969), das D1-Protein des Photosynthesesystems (Mattoo & Edelman, 1987) oder das Chaperon ANJ1 pflanzlicher Zellen (Zhu et al., 1993), Rhodopsin (Ovchinnikov et al., 1988) und G-Proteine (Manahan et al., 2000) tierischer Zellen sowie das Hüllmembranprotein gp160 des HI-Virus (Rousso et al., 2000).

#### 1.1.1 Lipidierung in eukaryotischen Zellen

Lipoproteine sind in eukaryotischen Zellen an wichtigen Prozessen wie Signaltransduktion, Vesikeltransport oder Zellteilung beteiligt. Die zielgerichtete Lokalisation der Proteine an Membranen durch den Lipidrest ist ein essentieller Faktor, der Einfluss auf die Funktionalität von Proteinen nimmt. Allgemein unterscheidet man drei Hauptformen der Lipidierung von Proteinen: S-Prenylierung, N-Myristylierung und Palmitylierung (Abb. 1.1; Yalovsky et al., 1999; Thompson & Okuyama et al., 2000).

**S-Prenylierung.** Eine S-Prenylierung stellt die posttranslationale Modifikation eines Proteins mit Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat aufgrund eines CaaX-Motivs innerhalb der C-terminalen Aminosäuresequenz dar. Dabei repräsentiert „C“ ein Cystein, „a“ eine aliphatische Aminosäure und „X“ ein Serin, Methionin, Cystein, Alanin, Glutamin oder Leucin innerhalb des Sequenzmotivs. Die Modifikation des Cysteins des Signalmotivs erfolgt über die Farnesyltransferase (FTase) oder die Geranylgeranyltransferase I und II (GGTase I und GGTase II) unter Ausbildung einer Thioether-Bindung (Charron et al., 2009).



**Abbildung 1.1. Strukturen zur Lipidmodifikation eukaryotischer Proteine mit kovalent gebundenen Fettsäuren.** Verändert nach Yalovsky et al., 1999.

Nach der Prenylierung finden eine proteolytische Spaltung des aaX-Motivs und die Methylierung des C-terminalen Cysteins statt. Bekannte Proteine, die in einem prenylierten Zustand vorliegen, sind die GTPasen Ras, Rho und Rab (Hannoush & Sun, 2010). Als Beispiele prenylierter pflanzlicher Proteine können genannt werden: Das Chaperon ANJ1 oder das Protein NAP1, das Funktionen innerhalb des Zellzyklus übernimmt, das Calmodulin Protein Cam53 oder das Protein AIG1, das funktionell an der Pathogenabwehr beteiligt ist (Yalovsky et al., 1999).

**N-Myristylierung.** Die N-Myristylierung erfolgt Co-translational und ist durch die amidische Verbindung von Myristinsäure (C14:0) mit einem N-terminalen Glycin gekennzeichnet. Erkennungssequenz zur Myristylierung stellt die Aminosäureabfolge MGXXS/T dar, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt (Yalowski et al, 1999). Der Transfer der Fettsäure wird durch das Protein N-Myristyltransferase (Nmt) katalysiert, nachdem eine Methionylaminopeptidase das initiale Methionin entfernt hat (Smotrys & Linder, 2004). Resultiert aus einem proteolytischen Verdau ein N-terminales Glycin, kann die Myristylierung in seltenen Fällen auch posttranslational erfolgen (Zha et al., 2000). Man geht davon aus,



dass 0.5% aller eukaryotischer Proteine und 2% aller pflanzlicher Proteine in einem myristylierten Zustand vorliegen (Hannoush & Sun, 2010; Traverso et al., 2008). Wichtige myristylierte Proteine eukaryotischer Zellen sind die Proteine der Src-Familie, die essentiell am Zellwachstum und der Zellteilung beteiligt sind. In pflanzlichen Zellen liegen Proteine der Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen in einem nachweislich myristylierten Zustand vor (Yalovsky et al., 1999) sowie der Proteinkomplex SnRK1, der essentiell an der Regulation von Stress-Signalen beteiligt ist (Traverso et al., 2008).

**Palmitylierung.** Die dritte Hauptform der Lipidierung von Proteinen eukaryotischer Zellen ist die Modifikation mit Palmitinsäure (C16:0). Im Gegensatz zur N-Myristylierung stellt die Palmitylierung eine posttranslationale Modifikation dar. Man unterscheidet drei Formen der Palmitylierung: (i) die N-Palmitylierung mit Anheftung einer Palmitinsäure über eine Amid-Verbindung an einem N-terminalen Cystein; (ii) die O-Palmitylierung mit Anheftung einer Palmitinsäure über eine Oxyester-Verbindung an Serin oder Threonin; (iii) die S-Palmitylierung, wobei die Verknüpfung von Palmitinsäure an ein Cystein über eine Thioester-Bindung erfolgt (Smotrys & Linder, 2004). Während die beiden ersten Varianten der Palmitylierung vor allem bei sekretorischen Signalmolekülen tierischer Zellen wie zum Beispiel Sonic-Hedgehog und Wnt vorliegen, ist für pflanzliche Zellen nur die Palmitylierung über eine Thioester-Verbindung bekannt (Smotrys & Linder, 2004). In tierischen Zellen stellen palmitylierte Proteine vor allem Regulatoren der Signaltransduktion dar, wie Proteine der Ras-Familie oder G-Proteine. Zu den Funktionen, die palmitylierte Proteine in Pflanzenzellen übernehmen, zählen neben der Beteiligung an Signalprozessen auch Funktionen bei der Pathogenabwehr, des intrazellulären Proteintransports und der Endocytose (Hemsley & Grierson, 2008). So konnte für das G-Protein ROP6, das Einfluss am polaren Wachstum von Wurzelhaaren hat, eine S-Palmitylierung nachgewiesen werden, ebenso wie für RIN4, ein Protein aus *Arabidopsis thaliana*, das an der Pathogenabwehr beteiligt ist (Hemsley & Grierson, 2008). Im Gegensatz zur Myristylierung oder Farnesylierung, die eine geringe Affinität zu Membrankompartimenten bedingen, erzeugen Palmitylierungen stabile Membranassoziationen. Untersuchungen der Sequenzmotive verschiedener palmitylierter Proteine konnten außer der Anwesenheit eines Cysteins keine definierte Konsensus-Sequenz, durch die eine Palmitylierung vorhergesagt werden kann, ermitteln (Hemsley & Grierson, 2008).

Die Palmitylierung von Proteinen kann auf einem nicht-enzymatischen Weg autokatalytisch in der Gegenwart von langkettigem Acyl-CoA stattfinden oder auf enzymatischem Weg vermittelt durch Protein-Acyltransferasen. *In vivo* verlaufen Autoacylierungen sehr langsam

und spielen daher nur in Mitochondrien eine Rolle, wo sie zur Regulation der Aktivität von Proteinen auftreten, wie für die Carbamoylphosphat-Synthetase gezeigt werden konnte (Corvi et al., 2001).

Enzymvermittelte Palmitylierungen laufen in Abhängigkeit von Protein-Acyltransferasen (PATs) ab. Da diese Enzyme Membranproteine darstellen, ist die Membranassoziation der Prolipoproteine eine Voraussetzung für eine Palmitylierung. Eine bestehende Prenylierung oder N-Myristylierung begünstigt die Lokalisation an Membrankompartimenten und eine anschließende Palmitylierung (Quesnel & Silvius, 1994) ebenso wie das Vorliegen basischer Aminosäuren innerhalb des Sequenzmotivs (sogenannter Sequenz-Kontext; Belanger et al., 2001). Für Hefezellen konnten die zwei PATs Erf2/Erf4 und Akr1 identifiziert werden, die als integrale Membranproteine selbst in einem palmitylierten Zustand vorliegen. Daneben konnte auch für eine Reihe von Pflanzenarten wie *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* oder *Triticum aestivum* die Anwesenheit von PATs bestätigt werden. Die Palmitylierung stellt eine reversible Modifikation dar, die durch die Aktivität von Thioesterasen konstitutiv oder als Antwort auf Signale revidiert werden kann. Eine bekannte Thioesterase ist die Acyl-Protein Thioesterase 1 (APT1), die stark konserviert in Hefe- und Säugerzellen vorliegt und die Depalmitylierung von Signalproteinen wie zum Beispiel H-Ras oder G-Protein-Untereinheiten übernimmt (Duncan & Gilman, 2002). Da die Palmitylierung von Proteinen die einzige reversible Lipidmodifikation darstellt, ist sie maßgeblich an der Regulation der Membranassoziation von Proteinen beteiligt.

### 1.1.2 Lipidierung in prokaryotischen Zellen

Das erste bakterielle Protein, für das eine kovalente Bindung zu Fettsäuren nachgewiesen werden konnte, ist das Braun'sche Lipoprotein von *E. coli* (Braun & Rehn, 1969). Analysen des Fettsäurerests ergaben, dass hauptsächlich Palmitinsäure an der Amid-Bindung beteiligt ist, während die beiden Fettsäuren der Thioether-Verbindung in ihrer Zusammensetzung mit der der Phospholipide vergleichbar sind (Hantke & Braun 1973). Allein in den folgenden 30 Jahren seit der Entdeckung dieses bakteriellen Oberflächenproteins konnten mehr als 450 weitere Lipoproteine identifiziert werden (Babu & Sankaran, 2002). Inzwischen weiß man, dass typischerweise 1% - 3% des bakteriellen Genoms für lipidierte Proteine kodieren (Babu et al., 2006).

Lipoproteine bilden die Oberflächenstruktur bakterieller Zellen. Strukturell unterscheiden sich die Proteinkörper sehr stark untereinander, weshalb Lipoproteine in keine einheitliche

Gruppe eingeteilt werden können. Diese Tatsache spiegelt sich auch in den diversen Funktionen, die lipidierte Proteine wahrnehmen, wider. So sind Lipoproteine prokaryotischer Zellen an Vorgängen wie der Substratbindung und des Substrattransports, der Adhäsion zu Zellen und Substraten, der Konjugation, Sporulation und der Pheromonrezeption beteiligt (Sutcliffe & Russel, 1995) und tragen gar zur Entgiftung von Antibiotika bei, wie für das Lipoprotein Penicillinase gezeigt werden konnte (Lai et al., 1981).

Ein charakteristisches Merkmal aller bakterieller Lipoproteine ist die sogenannte Lipobox, eine Abfolge von fünf Aminosäuren innerhalb des C-terminalen Endes einer N-terminalen Signalsequenz. Diese Aminosäurefolge ist innerhalb prokaryotischer Zellen hoch konserviert (Babu & Sankaran, 2002) und wird von den Enzymen der Lipidierungsmaschinerie erkannt (Wu, 1996). Die typische Lipobox prokaryotischer Zellen wird durch folgende Aminosäureabfolge charakterisiert: -Leu (Ala,Val)<sub>4</sub>-Leu<sub>3</sub>-Ala (Ser)<sub>2</sub>-Gly (Ala)<sub>1</sub>-Cys<sub>+1</sub>-. Da die Anheftung der Fettsäuren während der Lipidierung ausschließlich am Cystein an Position +1 erfolgt, repräsentiert das Cystein eine essentielle Aminosäure innerhalb der Lipobox und ist daher invariabel.

Die Prozessierung der Lipoproteine in prokaryotischen Zellen ist stark mit ihrer Sekretion verbunden. Die N-terminale Signalsequenz der Lipoproteine fungiert als Erkennungssignal für die Maschinerie des sekretorischen Systems, das sich aus den sekretorischen Proteinen SecA, SecB, SecD, SecE, SecF und SecY zusammensetzt (Schatz & Beckwith, 1990). Alternativ zum Export über den Sec-Weg werden einige Lipoproteine über das Tat (Twin Arginin Transport)-System exportiert. Dies erfolgt in Abhängigkeit eines Arginin-Arginin-Motivs innerhalb der Aminosäuresequenz des Signalpeptids. Im Unterschied zum Sec-System erfolgt der Transport der Proteine über das Tat-System im gefalteten oder gar oligomeren Zustand, wie für das DmsA Protein von *Shewanella oneidensis* gezeigt werden konnte (Sargent et al., 2006; Gralnick et al., 2006). Die enge Verbindung zwischen lipidmodifizierenden und sekretorischen Enzymen konnte durch die Akkumulation von Prolipoprotein in *E. coli*-Mutanten, die Defekte im sekretorischen System aufwiesen, gezeigt werden (Hayashi & Wu, 1985; Sugai & Wu, 1992).

Typischerweise besteht eine Signalsequenz oder ein Signalpeptid aus etwa 16-20 Aminosäuren und setzt sich aus drei Teilen zusammen: Einer positiv-geladenen N-terminalen Region, einem hydrophoben Mittelteil und einer polaren C-terminalen Region, die die Lipobox enthält (Hayashi & Wu, 1990). Erkennung der Signalsequenz durch Enzyme der sekretorischen Systeme führt zur Assoziation des Prolipoproteins an der Cytoplasmamembran, wo die Enzyme zur Lipidmodifikation lokalisiert sind. Der Prozess der

Lipidierung ist für Gram-negative Zellen bekannt und stützt sich auf das Vorhandensein der drei Enzyme Lgt, Lsp und Lnt (Abb. 1.2):

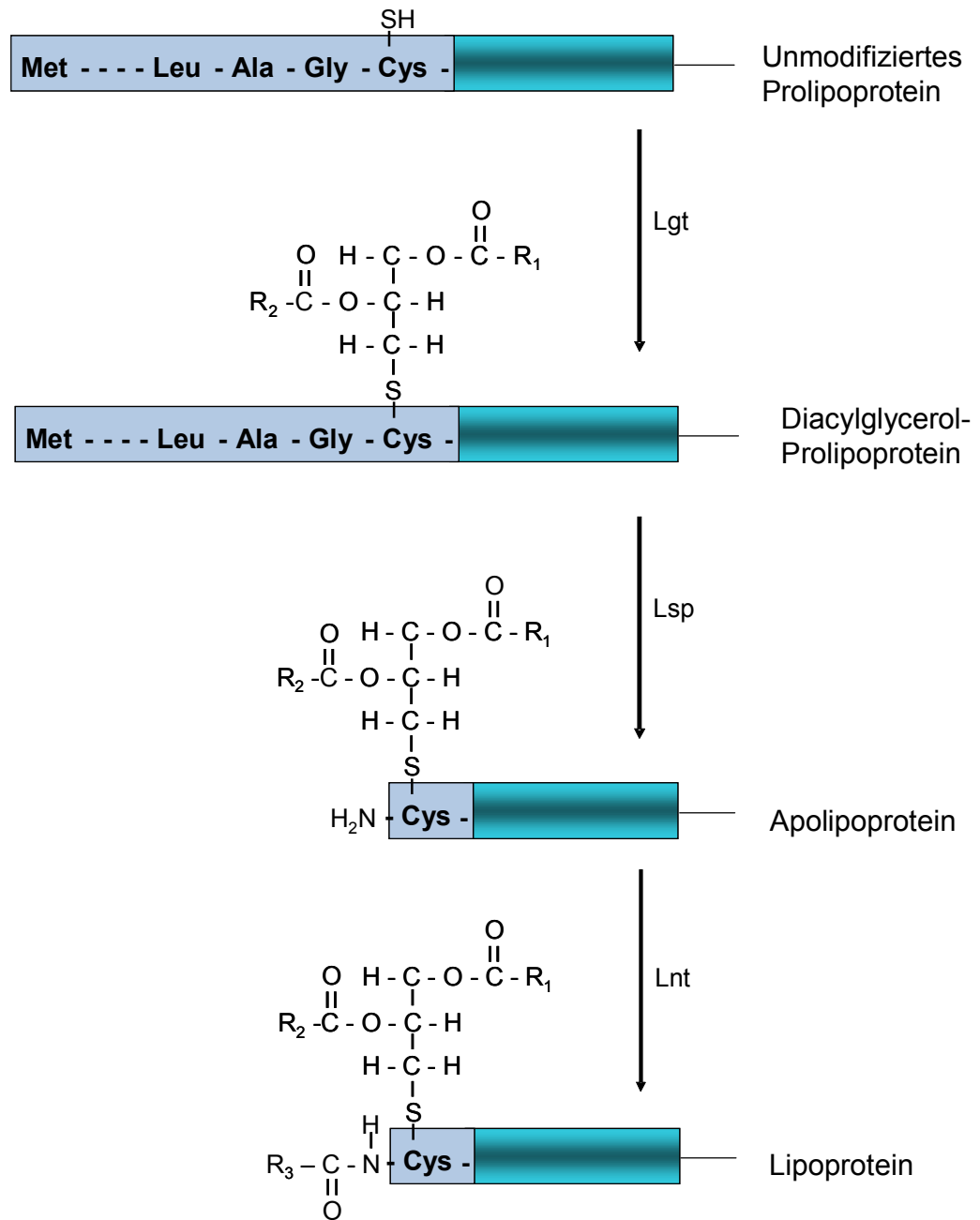
**Phosphatidylglycerol:Prolipoprotein Diacylglyceryltransferase (Lgt).**

Phosphatidylglycerol:Prolipoprotein Diacylglyceryltransferase, die vom bakteriellen *lgt*-Gen kodiert wird, stellt das erste Enzym in der posttranslationalen Modifikation der Prolipoproteine dar. Dieses Membranprotein mit einer molaren Masse von 33 kg/Mol erkennt die Aminosäurefolge der Lipobox und fügt als ersten Schritt in der Modifikation des Prolipoproteins Diacylglycerol über eine Thioether-Bindung an die freie SH-Gruppe des konservierten Cysteins an Position +1 an.

**Prolipoprotein Signalpeptidase (Lsp).** Als zweiter Schritt in der Lipidierungsmaschinerie erfolgt die proteolytische Spaltung der Signalsequenz an Position -1 durch das integrale Membranprotein Prolipoprotein Signalpeptidase, kodiert vom *lsp*-Gen.

**Apolipoprotein N-Acyltransferase (Lnt).** Die dritte Modifikation auf dem Weg zum Lipoprotein wird von der Apolipoprotein Acyltransferase (vom *lnt*-Gen kodiert) ausgeführt. Dieses Membranprotein überträgt unter Ausbildung einer Amid-Verbindung eine Fettsäure an die nun freie Amino-Gruppe des konservierten Cysteins. Die Deletion des *lnt*-Gens führt zur Retention des Lipoproteins an der Plasmamembran mit letalem Effekt für die Zelle (Robichon et al., 2005). Als Fettsäure-Donor für Lgt dienen in erster Linie die Phospholipide Phosphatidylglycerol aber auch Phosphatidylethanolamin oder Cardiolipin der bakteriellen Hüllmembran, während Lnt keine Spezifität gegenüber bestimmten Phospholipiden der Hüllmembran als Substrat zeigt (Sankaran & Wu, 1994).

Nach der Modifikation erfolgt über den Lol (Lipoprotein-Lokalisierungs)–Weg in Abhängigkeit der Aminosäure an Position +2 entweder der Export der Lipoproteine an die Hüllmembran oder ihre Retention an der Cytoplasmamembran (Narita et al., 2004; Terada et al., 2001).



**Abbildung 1.2. Schematische Darstellung zur Lipidmodifikation Gram-negativer Bakterien.** In Blau angegeben ist die Lipobox und das initiale Startmethionin einer N-terminalen Signalsequenz. Der Proteinkörper ist blau schattiert dargestellt. An den Pfeilen stehen die für die jeweilige Modifikation verantwortlichen Enzyme Lgt, Lsp und Lnt. R1/R2/R3: Variable Fettsäurereste. Verändert nach Wu, 1996.

Lipoproteine Gram-positiver Zellen gelten als Äquivalente der periplasmatischen Lipoproteine Gram-negativer Zellen (Hutchings et al., 2008). Die Biogenese dieser Proteine verläuft über die Anheftung eines Diacylglycerol-Rests mittels Lgt und der Abspaltung der Signalsequenz durch Lsp und entspricht damit den ersten beiden Schritten des für Gram-negative Bakterien gültigen Synthesewegs (Abb. 1.2). Die anschließende N-Acylierung entfällt jedoch häufig bei Gram-positiven Bakterien, so dass die Lipidmodifikation dieser Organismen in einer Modifikation mit zwei Fettsäuren resultiert. Obwohl gezeigt werden konnte, dass einige Gram-positive Zellen eine N-Acylierung rekombinanter Proteine ausführen können, konnte kein *Int*-Homolog in diesen Zellen identifiziert werden. Auf der anderen Seite sind Lnt-homologe Proteine in einigen Gram-positiven Zellen bekannt, eine N-Acylierung konnte für diese Bakterien jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Hutchings et al., 2008; Rezwan et al., 2007).

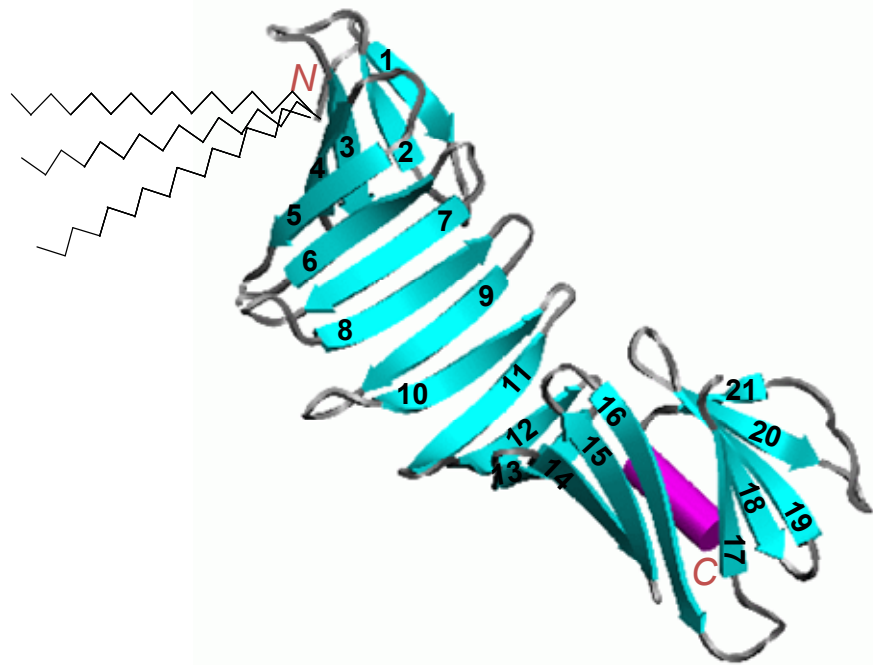
Aufgrund der konservierten Struktur und ihrer Lokalisation auf der Zelloberfläche zählen bakterielle Lipoproteine neben Lipopolysacchariden, Flagellin, Peptidoglycan und bakterieller DNA zu den Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). PAMPs sind konservierte bakterielle Strukturen, die von Rezeptor-Zellen des nativen Immunsystems des Wirts, sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), erkannt werden. Als Antwort auf die Detektion von PAMPs durch TLRs erfolgt die Produktion proinflammatorischer Signale. Zu diesen zählen die Cytokin-Produktion, Expression von Adhesionsmolekülen und die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (Hirschfeld et al., 1999). Infolge dieser Signale beginnt die Aktivierung der Zellen des adaptiven Immunsystems und die Abwehr der Erreger. Aufgrund ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften stellen bakterielle Lipoproteine geeignete Vakzin-Kandidaten dar.

### 1.2 Lyme-Borreliose und OspA

Ein prominentes Beispiel eines bakteriellen Lipoproteins ist das Outer surface protein A (OspA) des Gram-negativen Spirocheten-Bakteriums *Borrelia burgdorferi*, das im Jahre 1982 erstmals als Erreger der sogenannten Lyme-Borreliose identifiziert werden konnte (Burgdorfer et al., 1982). Lyme-Borreliose ist eine chronisch verlaufende Multisystem-Erkrankung, die sich seit ihrem ersten Auftreten anfangs des 20. Jahrhunderts in Schweden zu einer endemischen Erkrankung mit mehr als 15 000 Neuinfektionen pro Jahr allein in den USA entwickelt hat (Thanassi & Schoen, 2000; Willet et al., 2004). Als Erreger gelten verschiedene Arten der Gattung *B. burgdorferi* sensu lato, wobei in Amerika das Auftreten lediglich des Typs *B. burgdorferi* sensu stricto, in Europa aber noch mindestens das Auftreten von *B. garinii* und *B. afzelii* bekannt ist (Van Hoescke et al., 1996; Poland & Jacobson, 2001; Steere et al., 2004). Als Überträger des Krankheitserregers dienen Zecken der Gattung *Ixodes ricinus*. Die Borrelien befinden sich im Mitteldarm infizierter Zecken, wo ihnen OspA zur Verankerung an der Darmwand dient (Pal et al., 2000). Die Übertragung der Spirocheten erfolgt innerhalb von 36-72 Stunden nach einem Zeckenbiss (Piesman, 1993): Durch die Aufnahme des Säugetierbluts in den Darm der Zecke kommt es zu einem Anstieg der Temperatur und einem Abfall des pH-Werts im Verdauungstrakt von *Ixodes* (Guerau-de-Arellano & Huber, 2005). Die Veränderung dieser Parameter bedingt eine Reduktion der Expression von *ospa*, worauf sich die Borrelien von der Darmwand der Zecke lösen und in die Speicheldrüsen wandern. Von dort gelangen sie über die Haut schließlich in die Blutbahn von Mensch und Tier und rufen Erkrankungen unterschiedlichster Symptomatik hervor (Guerau-de-Arellano & Huber, 2005; Grimm et al., 2004). In einem frühen Infektionsstadium ist Borreliose noch sehr gut durch Verabreichung von Antibiotika zu behandeln. Aufgrund des Mangels einheitlicher Symptome ist die Diagnose der Erkrankung jedoch oft erschwert (Willet et al., 2004). Wird eine Infektion nicht rechtzeitig diagnostiziert, kommt es zu schwerwiegenden neurologischen, kardiologischen oder dermatologischen Schäden, die häufig nicht mehr therapierbar sind (Van Hoescke et al., 1996, Dunn et al., 1990). Präventionsmaßnahmen zur Vorbeugung eines Zeckenbisses und der Übertragung der Erreger sind daher von höchster Priorität zum Schutz vor einer Borreliose-Infektion.

### 1.2.1 Outer surface protein A (OspA)

Das bakterielle Oberflächenprotein OspA von *B. burgdorferi* wird von einem linearen Plasmid kodiert und weist eine molare Masse von  $31 \cdot 10^3$  g/Mol auf (Jiang et al., 1994). Strukturell besteht OspA aus 21 antiparallelen Aminosäuresträngen in Form eines  $\beta$ -Faltblatts, die N- und C-Terminus verbinden, wobei die Aminosäuren des C-Terminus eine  $\alpha$ -helikale Konstitution bilden. Am N-Terminus trägt das Protein eine Lipidmodifikation, bei der an einem Cystein innerhalb der N-terminalen Sequenz über eine Thioether-Bindung ein Dipalmitylglycerin und über eine Amid-Bindung ein dritter Palmitinsäurerest angefügt sind, woraus eine sogenannte Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur resultiert (Abb. 1.3; Luft et al., 2002). Eine rekombinante Synthese des Proteins ist in Zellen von *E. coli* möglich (Erdile et al., 1993) und resultiert in der korrekten posttranslationalen Modifikation mit einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur.



**Abbildung 1.3. Kristallstruktur von OspA.** Abgebildet ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur des Proteins bestehend aus 21 antiparallelen Aminosäuresträngen, einer kurzen  $\alpha$ -helikalen Region (dargestellt in Lila) sowie N- und C-Terminus. Schematisch angefügt ist die Lipidmodifikation des Proteins am N-Terminus bestehend aus drei Palmitinsäureresten (verändert nach Li et al., 1997).



Als lipidiertes Oberflächenprotein mit Lokalisation an der äußeren Hüllmembran zählt OspA zur Gruppe der PAMPs und stimuliert somit die Zellen des nativen Immunsystems. Für OspA konnte die Auslösung einer Immunantwort aufgrund der Aktivierung von TLR-2-Zellen nachgewiesen werden. Die Aktivierung von TLR-2 erfolgt dabei in Abhängigkeit der Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur von OspA (Hirschfeld et al., 1999; Sobek et al., 2004), obwohl der gebildete protektive Antikörper LA-2 gegen den Proteinkörper des Antigens gerichtet ist (Weis et al. 1994, Ding et al., 2000, Sears et al., 1991). Aufgrund dieser Tatsache übernimmt der Lipidkörper von OspA die Funktion eines sogenannten internen Adjuvanz, das die Bildung reaktiver Antikörper stimuliert und zu einer protektiven Immunantwort führt.

Als Adjuvantien bezeichnet man im Allgemeinen Verbindungen, die stimulatorisch auf das Immunsystem wirken und somit die Immunogenität eines Antigens erhöhen (Kaufmann, 2004). Die gängigsten zur Verwendung am Menschen zugelassenen Verbindungen sind Aluminiumhydroxid beziehungsweise Aluminiumphosphat und Kalziumhydrogenphosphat. Eine stärkere immunstimulatorische Wirkung ist für die organische Verbindung Squalen bekannt, die als Bestandteil verschiedener Influenza-Vakzine Einsatz findet (Gießen, 2007). Daneben besitzen auch bakterielle Strukturen (PAMPs) eine starke immunstimulatorische Wirkung, wie zum Beispiel MPL-A (Monophosphoryl-Lipid A), ein Derivat aus Bakterienwänden, das als wirksamer Bestandteil des HPV-Impfstoffes Cervarix (Glaxo SmithKline Biologicals) Anwendung findet (Schwarz, 2009).

### 1.2.2 OspA als Vakzin

Bereits 1993 konnten Erdile *et al.* das immunogene Potential von OspA als Vakzin darlegen. Zur subkutanen Immunisierung wurde rekombinantes OspA aus *E. coli* Mäusen verabreicht. Wie sich zeigte, löste lipidiertes OspA sowohl alleine als auch in Verbindung mit Aluminiumhydroxid als Adjuvanz eine starke Bildung der Immunglobuline G aus und konnte die Versuchstiere vor einer Infektion mit Borrelien schützen (Erdile et al., 1993).

Die Einführung eines Borreliose-Vakzins für Menschen folgte sechs Jahre nach den Forschungsarbeiten von Erdile *et al.* und stellte einen Meilenstein in der Borreliose-Prophylaxe dar. Der Impfstoff LYMERix<sup>TM</sup> (SmithKline Beecham) gelangte 1999 auf den amerikanischen Markt und enthielt OspA des Borrelien-Typs *B. burgdorferi* sensu stricto ZS7 als wirksamen Bestandteil (Steere et al., 1998). Das Protein wurde für diesen Zweck rekombinant in Zellen von *E. coli* produziert. Da neben *B. sensu stricto* in Europa weitere Typen von *Borrelia* an der Entstehung der Borreliose beteiligt sind, beschränkte sich die

Zulassung von LYMERix™ auf den amerikanischen Markt. Anders als bei herkömmlichen Impfstoffen, bei denen die Erreger nach Eintritt in die Blutbahn des Menschen durch die Bildung reaktiver Antikörper neutralisiert werden, zeichnet sich LYMERix™ durch eine unkonventionelle Wirkungsweise aus: Da die Expression von OspA in den Borrelien vor allem während des Aufenthalts der Erreger im Verdauungstrakt des Parasiten hoch ist, findet die Neutralisation der Borrelien durch reaktive Antikörper bereits im Darm der Zecke statt, noch bevor die Erreger in die Blutbahn des Menschen gelangen (Fikrig et al., 1992).

Sowohl die Wirksamkeit als auch die Sicherheit des Impfstoffs waren durch Studien belegt worden. Das Vakzin wurde zunächst erfolgreich verabreicht (Poland & Jacobson, 2001; Sigal et al., 1998), jedoch dann vom Hersteller aus wirtschaftlichen Gründen im Jahr 2002 wieder vom Markt genommen.

### 1.2.3 Rekombinantes plastidäres OspA (rpOspA)

Die Synthese von rekombinantem OspA in Pflanzenzellen erfolgte erstmals 2006 in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* (Glenz et al., 2006). Wie sich herausstellte, resultierte die Expression der Vollängesequenz *ospa* in einer Akkumulation eines palmitylierten Proteins zu einem Anteil von 1% des löslichen Gesamtproteins (LGP) im Blattmaterial transplastomer Pflanzen. Das Protein lag dabei in Assoziation zu Membranen des Thylakoidsystems vor (Hennig, 2006). Untersuchungen der Lipidstruktur ergaben, dass die Modifikation des rekombinanten Proteins in den Chloroplasten in einer Anheftung von zwei Palmitinsäureresten (Pam<sub>2</sub>Cys), wie sie für Gram-positive Zellen typisch ist, resultierte. Dabei konnte neben der Dipalmitylierung des Proteins auch die Anwesenheit des Signalpeptids bestätigt werden. Trotz der Abweichung in der Lipidstruktur induzierte rpOspA nach parenteraler Verabreichung an Mäusen eine protektive Immunantwort (Glenz et al., 2006). Die Expression einer Variante von *ospa* mit stark verkürzter N-terminaler Signalsequenz im Chloroplastengenom führte zur Akkumulation eines unlipidierten Proteins im Stroma. Im Gegensatz zum lipidierten Protein war die Akkumulationsrate der nicht lipidierten Form in den Chloroplasten um das 10-fache erhöht.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Produktion von OspA in Pflanzen eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen Produktion des rekombinanten Proteins in *E. coli* darstellt. Eine Optimierung der Akkumulationsrate und der Lipidierung sollte eine wirtschaftliche Produktion von rekombinantem OspA in transplastomen Pflanzen ermöglichen.

### 1.3 Synthese rekombinanter Proteine in Pflanzen

Nach der ersten erfolgreichen Transformation einer Pflanze im Jahr 1983 erfolgte bereits 1986 die Produktion des ersten pharmazeutisch relevanten Proteins, dem humanen Wachstumshormon, in transgenen Tabakpflanzen (Fraley et al., 1983; Ma et al., 2003). Die Produktion eines in Pflanzen erzeugten Antikörpers und Antigens folgten in den Jahren 1989 und 1992, womit zugleich gezeigt werden konnte, dass Pflanzen zur posttranslationalen Modifikation komplexer Strukturen befähigt sind (Hiatt et al., 1989; Mason et al., 1992). In den vergangenen Jahren wurden in unterschiedlichen transgenen Pflanzen, die als sogenannte Bioreaktoren bezeichnet werden, zahlreiche weitere therapeutisch relevante Proteine produziert. Diese reichen von Blutbestandteilen, Hormonen und Cytokinen über Antikörper bis hin zu Vakzinen (Tab.1.1), von denen eine Reihe bereits klinische Studien durchlaufen. Für den sekretorischen anti-Karies-Antikörper CaroRx™ (Planet Biotechnologie Inc.) und den humanen Intrinsic-Faktor (Cobento Biotech AS), ein Nahrungsergänzungsmittel bei Vitamin B12-Mangel, erfolgte mittlerweile die Zulassung zur Anwendung am Menschen (Faye & Gomord, 2010) und mit weiteren rekombinanten Therapeutika ist zu rechnen.

**Tabelle 1.1. Wichtige rekombinante Proteine mit therapeutischem Nutzen, deren Produktion in transgenen Pflanzen beschrieben ist.**

<i><b>Protein</b></i>	<i><b>Produktionssystem</b></i>	<i><b>Referenz</b></i>
<b><i>Therapeutische Proteine</i></b>		
Wachstumshormon	Tabak	Barta et al., 1986
Humanes Serumalbumin	Tabak	Fernandez-San Millan et al., 2003
Erythropoietin	Tabak	Matsumoto et al., 1995
Aprotinin	Tabak	Tissot et al., 2008
<b><i>Antikörper</i></b>		
CaroRx	Tabak	Larrick et al., 2001
IgG (Herpes simplex Virus)	Soja	Zeitlin et al., 1998
<b><i>Vakzine</i></b>		
Hepatitis B-Virus Hüllprotein	Tabak	Mason et al., 1992
<i>E. coli</i> Enterotoxin	Tabak, Kartoffel	Mason et al., 1998; Streatfield et al., 2001
Norwalk Virus Capsid-Protein	Kartoffel	Tacket et al., 2000
Cholera-Toxin B-Untereinheit	Tabak	Daniell et al., 2001.2

Im Gegensatz zu den bisher üblichen Produktionsplattformen rekombinanter Proteine wie *E. coli*, Hefezellen und Kulturen von Insekten- und Säugetierzellen stellt die Kultivierung transgener Pflanzen eine wirtschaftliche Methode zur Produktion rekombinanter Proteine im großen Maßstab dar (Kusnadi et al., 1997; Ma et al., 2003; Daniell et al., 2001.1). Ein praktischer Vorteil von Pflanzen liegt in der Möglichkeit eines großflächigen Anbaus mit Hilfe einfacher landwirtschaftlicher Methoden, die teure Fermentationstechniken ausschließen. Die Akkumulation rekombinanter Proteine in Speicherorganen wie Knollen oder Samen ermöglicht zudem eine Lagerung bei Außentemperaturen ohne Degradation des Proteins in Abwesenheit einer Kühlkette. Die sich daraus ergebende Kostenersparnis kann am Beispiel des Proteins Avidin veranschaulicht werden, für das die rekombinante Produktion in Maiskörnern bei 0.5% der Kosten der konventionellen Gewinnung des Proteins aus Hühnereiern liegt (Twyman et al., 2003). Ein weiterer Vorteil der Nutzung von Pflanzen als Bioreaktoren ist ein minimiertes Risiko der Verunreinigung rekombinanter Therapeutika mit Humanpathogenen oder Toxinen sowie die Möglichkeit einer direkten oralen Applikation rekombinanter Vakzine bei der Synthese in essbaren Pflanzenteilen (Daniell et al., 2001.1). Als Beispiele rekombinanter Vakzine aus Pflanzen, für die die Bildung reaktiver Antikörper nach oraler Immunisierung in Mäusen nachgewiesen werden konnten, zählen das hitzelabile Enterotoxin aus *E. coli*, das rekombinant in Tabak und Mais produziert wurde (Streatfield et al., 2001; Rosales-Mendoza et al., 2009), die B-Untereinheit des Choleratoxins (Arakawa et al., 1998) sowie Oberflächenproteine des Hepatits B- (Richter et al., 2000), des Norwalk- (Mason et al., 1998) und des humanen Papillomvirus (Warzecha et al., 2003). Im Falle des hitzelabilen Enterotoxins aus *E. coli* und Antigenen des Norwalk-Virus konnte bereits eine Immunantwort beim Menschen nach oraler Verabreichung nachgewiesen werden (Tacket et al., 1998; Tacket et al. 2000).

### 1.3.1 Stabile Chloroplastentransformation

Ein Großteil der bisher erzeugten rekombinanten Proteine wurde nach stabiler Transformation des Zellkerns erhalten. Dabei stellt das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* das effizienteste Werkzeug zur Generierung transgener Pflanzen dar. Da die Integration der Transgene bei Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer an vorhandenen Doppelstrangbrüchen der pflanzlichen DNA stattfindet, erfolgt keine zielgerichtete Integration in das Genom (Tzfira & Citovsky, 2006; Shrawat & Lörz, 2006). Zudem erhöht ein vielfacher Einbau von Fremd-DNA den Effekt des Gene Silencing, so dass die Akkumulationsrate

rekombinanter Proteine nach stabiler Kerntransformation einen Anteil von 1%-2% des LGP in der Regel nicht übersteigt (Arlen et al., 2007; Kusnadi et al., 1997).

Eine effektivere Methode zur Produktion rekombinanter Proteine stellt die stabile Integration von Transgenen in das Chloroplastengenom dar und die Produktion zahlreicher Proteine mit therapeutischem Nutzen in Chloroplasten ist beschrieben (Tabelle 1.2).

Chloroplasten stellen semiautonome Organellen pflanzlicher Zellen dar. Sie gehen auf prokaryotische Cyanobakterien als Vorfahren zurück, die durch Endocytose von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurden (Spence et al., 2003). Im Laufe der Evolution haben sie eine Veränderung erfahren, in der sie den Großteil ihres Genoms an den Zellkern verloren haben. Das 120 bis 160 Kilobasen-große Genom der Chloroplasten ist ein zirkuläres, doppelsträngiges Molekül mit etwa 130 verbliebenen Genen, die hauptsächlich für Proteine des Photosyntheseapparates und ihrer Biosynthese kodieren (Shimada & Sugiura, 1991; Stern et al., 1997). Ein charakteristisches Merkmal der Chloroplasten ist ein sogenannter polyploider Zustand, der durch die Anwesenheit zahlreicher Kopien ihres Genoms gekennzeichnet ist. Da die Chloroplasten der meisten Pflanzenarten rein maternal vererbt werden, ist eine unkontrollierte Verbreitung der Transgene über Pollen transplastomer Pflanzen auszuschließen.

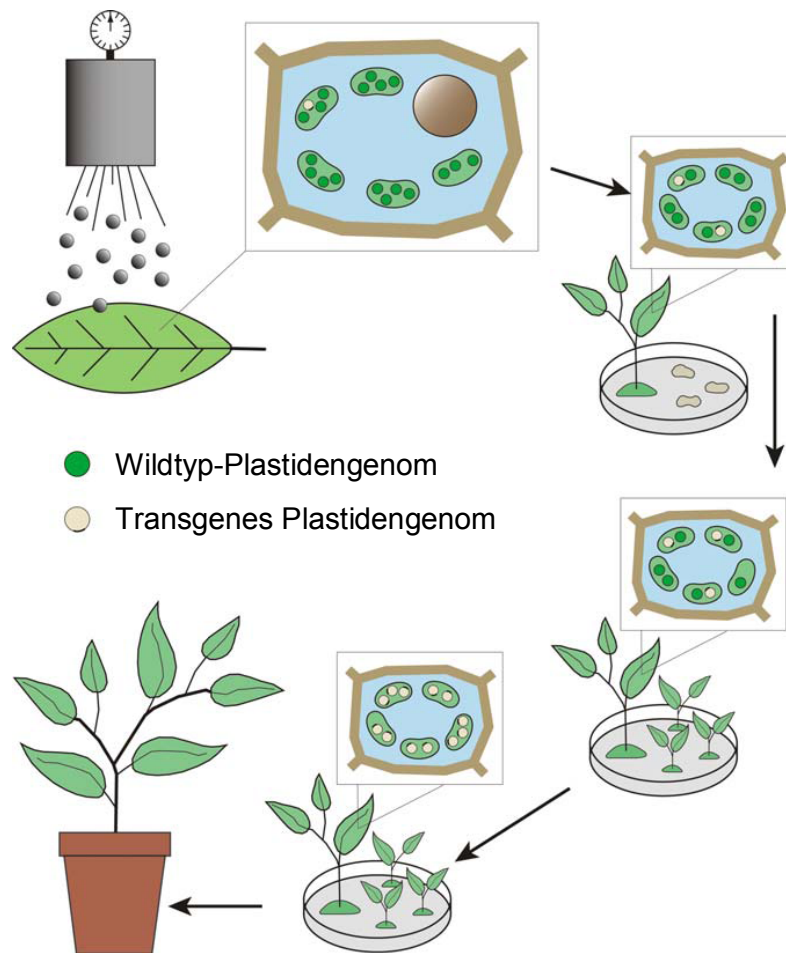
**Tabelle 1.2. Wichtige rekombinante Proteine mit therapeutischem Nutzen, deren Produktion in transplastomen Pflanzen beschrieben ist.**

<i><b>Protein</b></i>	<i><b>Referenz</b></i>
<i><b>Therapeutische Proteine</b></i>	
Humanes Somatotropin	Staub et al., 2000
Humanes Serumalbumin	Fernandez-San Millan et al., 2003
Humanes Proinsulin	Ruhlman et al., 2007
<i><b>Vakzine</b></i>	
Rotavirus (VP6)	Birch-Machin et al., 2004
Borreliose (OspA)	Glenz et al., 2006
Cholera (CtxB)	Daniell et al., 2001.2
Tetanus (TetC)	Tregoning et al., 2003
Humanes Papillomvirus (E7)	Morgenfeld et al., 2009
HIV (p24)	Zhou et al., 2008

Die Transformation des Chloroplastengenoms kann durch Inkubation isolierter Zellen mit Fremd-DNA in Anwesenheit von Polyethylenglycol (PEG) erfolgen (Golds et al., 1993) oder durch die direkte Injektion isolierter DNA in die Plastiden (Knoblauch et al., 1999). Eine weitaus praktischere und effizientere Methode stellt jedoch der Beschuss von Pflanzengewebe mit Mikroprojektilen mittels Genegun dar, der erstmals 1988 an der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* angewandt wurde (Boynton et al., 1988; Sanford et al., 1987).

Mittlerweile ist die biolistische Transformation von mindestens 15 verschiedenen Pflanzenarten beschrieben, zu denen auch Nutzpflanzen wie Reis, Kartoffel oder Karotte zählen (Warzecha & Hennig, 2010). Prinzip der biolistischen Transformation ist der Beschuss von pflanzlichem Gewebe mit DNA-beschichteten Mikropartikeln. Die Mikropartikel, bevorzugt Wolfram- oder Goldpartikel, dienen als Trägermaterial für die zu inserierende DNA und werden durch einen generierten Überdruck in das Gewebe eingebracht. Dabei durchdringen sie sowohl die Zellwand als auch die Hüllmembran der Chloroplasten. Die Integration der Expressionskassette erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien flankierender Bereiche mit der plastidären DNA. Dieser Vorgang, der als homologe Rekombination bezeichnet wird, führt zur zielgerichteten Integration des Transgens in das Chloroplastengenom. Da photosynthetisch-aktive Zellen eine Vielzahl von Chloroplasten besitzen, die selbst wiederum bis zu 100 Kopien ihres Genoms enthalten können, werden durch den Beschuss initial nur wenige Chloroplastengenome transformiert. Dieser Zustand wird als heteroplastisch bezeichnet und ist durch das gleichzeitige Vorkommen von Transgen- und WT-DNA in der Pflanzenzelle gekennzeichnet. Um stabile transplastome Pflanzen zu generieren, ist jedoch ein Ausschluss des WT-Genoms notwendig. Durch wiederholte Regeneration heteroplastischer Zellen unter Selektionsdruck kommt es schließlich zum Verlust des WT-Genoms und einem damit verbundenen stabilen, homoplastischen Zustand (Abb.1.4).

Aufgrund des hohen Grades an Polyploidie der plastidären DNA liegt die Proteinakkumulationsrate transplastomer Pflanzen mit einem Anteil von 1%-30% des LGP im Vergleich zur stabilen Kerntransformation deutlich höher (Verma et al., 2008; Lutz & Maliga, 2008). Außergewöhnlich hohe Akkumulationsraten von 40% bis 70% des LGP konnten für rekombinantes Phagen Lysin und das HIV Antigen p24 nach stabiler Chloroplastentransformation erzielt werden (Oey et al., 2009; Zhou et al., 2008).



**Abbildung 1.4. Schematische Darstellung zur Chloroplastentransformation.** Nach dem Beschuss der Blätter mit DNA-beschichteten Mikropartikeln kommt es durch homologe Rekombination zur zielgerichteten Integration der DNA in das Plastidengenom. In einem zunächst heteroplastischen Zustand liegen wenige transgene Plastidengenome in der Zelle vor. Durch wiederholte Regeneration auf Selektionsmedium kommt es zum Verlust des WT-Chloroplastengenoms und einem stabilen, homoplastischen Zustand der transplastomen Pflanze. Abbildung aus Warzecha & Hennig, 2010.

Ein weiterer Faktor, der die Proteinakkumulation transplastomer Pflanzen positiv beeinflusst, ist die zielgerichtete Integration der Transgene und das damit verbundene Fehlen von Positions- und Gene Silencing-Effekten (Verma et al., 2008). Zudem besitzen Chloroplasten in ihrem Stroma abweichende Mechanismen zum Proteinabbau als im Cytosol, was zu einer geringeren Degradation rekombinanter Proteine beitragen kann (Bock, 2001). Da therapeutische Proteine häufig komplexe Moleküle wie Antikörper und Antigene darstellen,

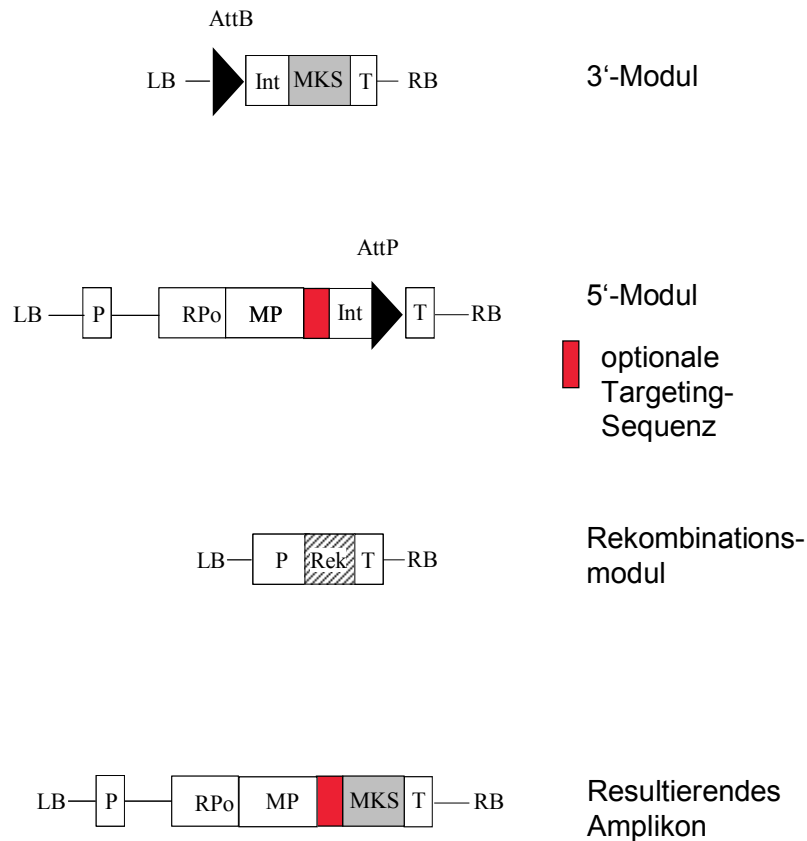
deren Struktur relevant für ihre biologische Aktivität ist, ist eine korrekte posttranslationale Modifikation von großer Bedeutung. Wie gezeigt werden konnte, sind Chloroplasten zur Ausbildung komplexer posttranslationaler Modifikationen fähig. Diese schließen die Bildung von Disulfidbrücken (Fernandez-San Millan et al., 2003; Bally et al., 2008; Tissot et al., 2008), Faltung und Assembly komplexer Moleküle (Daniel et al., 2001.2; Birch-Machin et al., 2004; Lenzi et al., 2008; De Cosa et al., 2001) sowie posttranslationale Lipidierungen ein (Glenz et al., 2006). Die Organisation der plastidären Gene in Operons bietet zudem den Vorteil der Expression multipler Gene unter der Kontrolle eines Promoters (Ruf et al., 2001). Durch die Kombination prokaryotischer und eukaryotischer Eigenschaften stellen Chloroplasten ein komplexes Expressionssystem dar, das erfolgreich zur Synthese vielfältiger rekombinanter Proteine genutzt werden kann.

### 1.3.2 Transiente Expression

Eine Alternative zur stabilen Transformation des Zellkerns und des Chloroplastengenoms stellt die transiente Expression von Transgenen dar. Transiente Expressionssysteme beruhen auf viralen Vektoren, die sich von Pflanzenviren wie dem Tabakmosaikvirus oder dem Kartoffel X-Virus ableiten und meist über Agrobakterien-vermittelten Transfer in die Pflanzenzelle gelangen (Marillonnet et al., 2005). Durch Modifikation der viralen Vektoren und Insertion von Fremd-DNA entstehen rekombinante Plasmide, die transient in der Pflanzenzelle exprimiert werden. Da besonders Virus-Capsid-Proteine einer starken Expression in der Pflanzenzelle unterliegen, finden vor allem Derivate des Tabakmosaikvirus Anwendung, bei denen ein Austausch des Capsid-Protein-Gens mit einem Transgen vorliegt (Gleba et al., 2004). Ein großer Vorteil transienter Expressionssysteme ist ihre Schnelligkeit. Anders als bei stabiler Transformation liegen hier zwischen Transformation und Proteinsynthese nur wenige Tage. Aufgrund einiger Nachteile, wie der geringen Akkumulationsrate rekombinanter Proteine, dem Umgang mit viraler RNA und einer zeitaufwendigen manuellen Inokulation der Konstrukte in das Pflanzenmaterial, spielten transiente Expressionssysteme lange Zeit eine untergeordnete Rolle für die Produktion rekombinanter Therapeutika. Dies änderte sich im Jahre 2004 mit der Entwicklung des Magniffection Systems der Firma ICON Genetics, mit dem Proteinakkumulationsraten von bis zu 80% des LGP erzielt werden können (Marillonnet et al., 2004; Marillonnet et al., 2005). Das Prinzip dieses Systems beruht auf der Verwendung viraler Pro-Vektor-Module, die durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in die Pflanzenzelle gelangen und dort zu einem

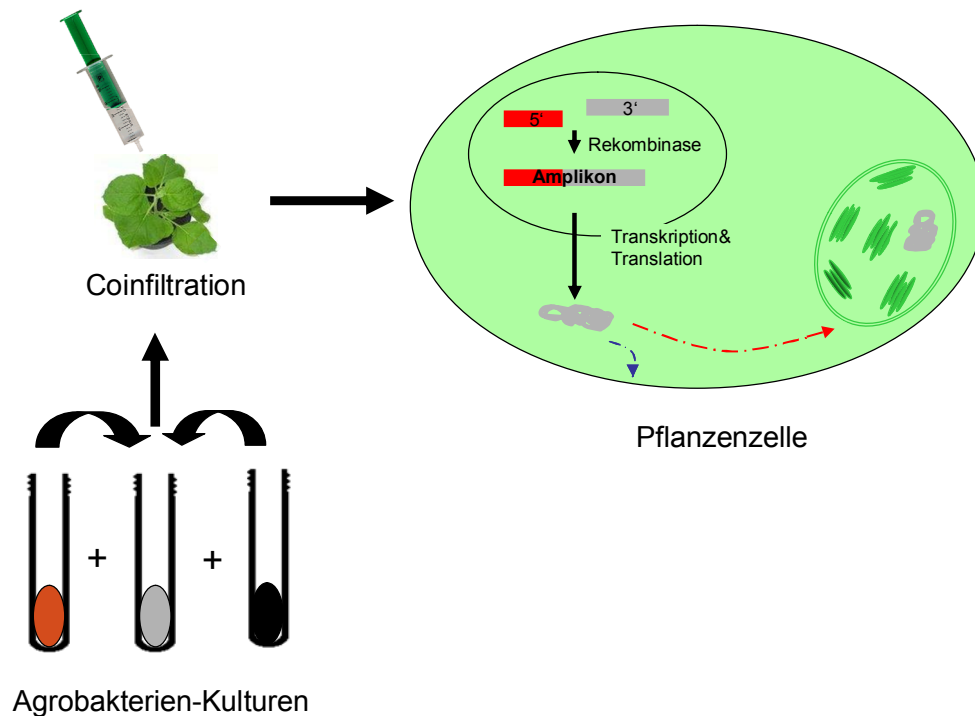


transkribierbaren Amplikon zusammengesetzt werden. Die Pro-Vektor-Module leiten sich dabei vom Tabakmosaikvirus und dem Turnip Vein-Clearing-Virus ab und werden in drei Gruppen unterteilt: 3'-Pro-Vektor-Modul (3'-Modul), 5'-Pro-Vektor-Modul (5'-Modul) und Rekombinationsmodul (Abb. 1.5). Das 3'-Modul verfügt über eine multiple Klonierungsstelle (MKS), in die die zu exprimierenden Gene einkloniert werden können. Diese wird von der Rekombinationssequenz *attB* und einem Intron flankiert. Strangabwärts der MKS befindet sich der Terminator der Nopalin-Synthase *Tnos*.



**Abbildung 1.5. Schematische Darstellung des zur transienten Expression verwendeten modularen Systems.** Abgebildet sind 3'-, 5'- und Rekombinationsmodul sowie das nach Rekombination und Spleißen resultierende Amplikon. LB: Left Border; RB: Right Border; Int: Intronsequenz; P: Promoter *Pnos*; T: Terminator *Tnos*; RPo: Sequenz kodierend für eine RNA-Polymerase; Rek: Sequenz kodierend für die Rekombinase; MP: Sequenz kodierend für das Movementprotein; MKS: Multiple Klonierungsstelle; *attB/attP*: Rekombinationssequenzen. Weitere Erklärungen im Text.

Die 5'-Module des Systems kodieren im Allgemeinen für eine RNA-abhängige Polymerase (RPO), die unter der Kontrolle des Promoters *Pnos* steht und von einer Sequenz, die für ein Movement-Protein (MP) kodiert, gefolgt wird. Aufgabe des MP ist die systemische Verteilung der entstehenden RNA innerhalb der Pflanze. Strangabwärts des *mp*-Gens befindet sich in entsprechender Reihenfolge eine Intronsequenz, die Rekombinationssequenz *attP* und die Sequenz des Terminators *Tnos*. Das Rekombinationsmodul kodiert für eine Rekombinase, die aufgrund der Anwesenheit eines Signalpeptids nach der Translation in den Zellkern zurückgeleitet wird und dort die Rekombinationssequenzen *attB* und *attP* von 3'- und 5'-Modul erkennt. Nach der Rekombination der beiden Module erfolgt das Spleißen der Intronsequenzen, so dass schließlich ein translatierbares Amplikon in das Cytosol entlassen wird (Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6. Schematische Darstellung des transienten Expressionssystems.** Agrobakterien-Kulturen, die mit 5'-Modul (rot), 3'-Modul (grau) und Rekombinationsmodul (schwarz) transformiert wurden, werden zur Coinfiltration von *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet. Im Zellkern der pflanzlichen Zelle entsteht durch die Aktivität der Rekombinase und anschließendem Spleißen aus 3'- und 5'-Modul ein transkribierbares Amplikon. Nach der Translation verbleibt das Protein je nach verwendetem 5'-Modul im Cytosol oder kann in die Chloroplasten (roter Pfeil), das ER oder den Apoplasten (blauer Pfeil) entlassen werden.

Das ICON-System zeichnet sich durch einen sehr vielseitigen Charakter aus, da durch Verwendung verschiedener 5'-Module ein gerichteter Transport der Proteine in die verschiedenen Zellkompartimente Chloroplast, Apoplast und Endoplasmatisches Retikulum (ER) erfolgen kann. Zu diesem Zweck tragen die entsprechenden 5'-Module direkt strangabwärts des *mp*-Gens Sequenzen, die für unterschiedliche Targeting-Peptide kodieren. Dadurch besteht zum einen die Möglichkeit der Untersuchung posttranslationaler Modifikationen in Abhängigkeit der Lokalisation des Proteins in der Zelle, zum anderen kann durch Retention des rekombinanten Proteins in Protease-armen Kompartimenten wie dem ER die Proteinakkumulation gesteigert werden, wie für das Hepatitis B-Antigen gezeigt werden konnte (Richter et al., 2000).

Die Transfektion der Pflanzenzellen mit den Pro-Vektor-Modulen erfolgt über Coinfiltration transgener Agrobaktariensuspensionen. Die Expression des Transgens beginnt bereits drei Tage nach der Infiltration und kann bis zu Tag 14 pi detektiert werden (Marillonnet et al., 2004). Mit dem Magniffection System der Firma ICON Genetics steht ein günstiges System zur Erzeugung großer Mengen an rekombinantem Protein zur Verfügung, das den Vorteil der Schnelligkeit prokaryotischer Expressionssysteme mit der Möglichkeit posttranslationaler Modifikationen eukaryotischer Zellen verbindet.

### **1.4 Einfluss von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen auf Expressionsrate und Proteinakkumulation rekombinanter Proteine**

Eines der Hauptziele der Transgenexpression in Pflanzenzellen ist es, einen möglichst großen Ertrag der rekombinanten Proteine zu erzielen. Dieser ist sowohl von der Expressionsrate des Transgens als auch von posttranskriptionalen Modifikationen des Protein-Vorläufermoleküls abhängig. Sowohl für prokaryotische Zellen als auch transplastome Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die Identität der Kodons direkt strangabwärts des Startkodons, die sogenannte Downstream-Box, Einfluss auf die Expressionsrate von Genen nimmt (Herz et al., 2005; Nishikubo et al., 2005). Man spricht in diesem Fall vom sogenannten „Kodon-Usage“ (Tregoning et al., 2003): Durch Anpassung der Identität der für die entsprechenden Kodons kodierenden Nukleotide an den Wirtsorganismus kann eine Optimierung der Expressionsrate erzielt werden, wie für die rekombinante Synthese einer Nudix-Hydrolase in *E. coli* oder für die rekombinante Produktion von humanem Somatotropin in Tabak-Chloroplasten gezeigt werden konnte

(Nishikubo et al., 2005; Staub et al., 2000). Daneben haben auch 3'- und 5'-untranslatierte Elemente (3'-UTR und 5'-UTR) großen Einfluss auf die Transkriptionsrate. Während 3'-UTRs in Bakterienzellen Funktionen in der Termination der Transkription haben, beugen sie bei der Expression in Pflanzenzellen der 3'-5' gerichteten exonukleolytischen Degradation vor (del Campo, 2009). Weitaus wichtiger ist jedoch die Identität der 5'-UTRs. Diese Sequenzen um das Startkodon bestimmen die Effizienz der Erkennung der RNA durch die Ribosomen und nehmen daher Einfluss auf die Translationsrate (Danon, 1997). Für prokaryotische Zellen ist das Vorhandensein der sogenannten Shine-Dalgarno-Sequenz für eine erfolgreiche Translation ausschlaggebend. Obwohl Chloroplasten prokaryotischen Ursprungs sind, konnte keine eindeutige Abhängigkeit der Translationsrate vom Vorhandensein Shine-Dalgarno-ähnlicher Sequenzen bestätigt werden (Stern et al., 1997). Vielmehr üben Sequenzen plastidärer Gene einen positiven Effekt auf die Syntheserate rekombinanter Proteine aus (Verma et al., 2008). So konnten Fernandez-San Millan *et al.* (2003) in Abhängigkeit plastidärer UTRs eine Steigerung der Akkumulation von rekombinantem humanem Serumalbumin von 0.02% auf 11.1% des Gesamtproteins nach der Expression in transplastomen Pflanzen nachweisen. Im Falle transplastomer Pflanzen üben daher vor allem posttranskriptionale Prozesse einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinakkumulationsrate aus, wobei meist die Translation des Precursor-Proteins einen limitierenden Faktor für die Proteinakkumulation darstellt (Verma et al., 2008; del Campo, 2009).

Ein weiterer Einfluss auf die Akkumulationsrate eines rekombinanten Proteins findet durch Signalpeptide statt. Nicht nur für die transiente Expression, sondern auch für die stabile Chloroplastentransformation stellen Signalpeptide geeignete Werkzeuge zum gezielten Transport von Proteinen dar. Im Falle transplastomer Pflanzen kann ein Targeting löslicher rekombinanter Proteine an das Thylakoidsystem durch Signalsequenzen des prokaryotischen Tat- oder des Sec-sekretorischen Systems erfolgen (Bally et al., 2008; Di Cola et al., 2005), wie für den Protease-Inhibitor Aprotinin gezeigt werden konnte (Tissot et al., 2008). In Verbindung mit einem geringen Protease-Gehalt, wie er auch für das Endoplasmatische Retikulum bekannt ist, eignet sich das Thylakoidlumen zur Lagerung von Proteinen, die anfällig für Degradationen sind (Tissot et al., 2008). Trotz allem sind Expressionsrate und Proteinakkumulation rekombinanter Proteine nicht vorhersagbar, da auch externe Faktoren wie Pflanzen- oder Blattalter und Lichtintensitäten Einfluss auf Expression, Translation und Protein-Degradation nehmen, wie am Beispiel der rekombinanten Proteine VP6 (Rotavirus) und Erythropoietin bei der Synthese in

transplastomen Tabakpflanzen gezeigt werden konnte (Herz et al., 2005; Birch-Machin et al., 2004; Conley et al., 2010). Desweiteren können Nukleotid- und Aminosäuresequenzen in unterschiedlichen Wirtsorganismen unterschiedlich erkannt und prozessiert werden. Das N-terminale Signalpeptid des Lipoproteins OspA führt nach rekombinanter Synthese in Zellen von *E. coli* zur korrekten posttranslationalen Modifikation, bei der Synthese in Tabakchloroplasten verläuft diese Modifikation jedoch nur teilweise (Hansson et al., 1994; Glenz et al., 2006). Dadurch lässt sich keine Voraussage über Expression und Translation von rekombinanten Proteinen in verschiedenen Organismen machen. Da Sequenzen auf Ebene der Nukleotide und Aminosäuren aber großen Einfluss auf die Interaktion mit Enzymen und Zellkompartimenten ausüben, ist die Wahl geeigneter Sequenzmotive für die erfolgreiche Synthese rekombinanter Proteine relevant und eine individuelle Anpassung dieser Sequenzen gegebenenfalls nötig.

### 1.5 Fragestellung

Die Synthese zahlreicher rekombinanter Proteine in transgenen Pflanzen ist beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pflanzen zur posttranslationalen Modifikation rekombinanter Proteine fähig sind, die jedoch nicht immer in korrekter Weise vorliegt. Obwohl verschiedene Sequenzmotive in unterschiedlichen Organismen in gleicher Weise erkannt und prozessiert werden können, ist oft eine Anpassung von Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen an den Wirtsorganismus sinnvoll, um eine Optimierung von Expressions- und Translationsrate sowie posttranslationaler Modifikation zu gewährleisten. Da die Nutzung von Pflanzen als Bioreaktoren nur bei einer entsprechend hohen Proteinakkumulation wirtschaftlich ist und insbesondere bei der Produktion oral applizierbarer Impfstoffe ein hoher Gehalt an rekombinantem Protein im Pflanzenmaterial erforderlich ist, ist eine möglichst hohe Proteinakkumulationsrate in transgenen Pflanzen anzustreben.

1. Im Falle von OspA konnte die Synthese einer rekombinanten Form in transplastomen Tabakpflanzen erfolgen, wobei die Lipidmodifikation des Proteins von der nativen Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur prokaryotischer Zellen abwich und die Akkumulationsrate 1% des LGP nicht überstieg. Zur Optimierung von Lipidmodifikation und Akkumulationsrate waren im Vorfeld im Rahmen einer Diplomarbeit vier neue OspA-Konstrukte kloniert und zur Transformation von Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* verwendet worden. Ziel der neuen OspA-

Konstrukte war es, durch Variationen der N-terminalen Signalsequenz des Proteins als auch unter Verwendung eines alternativen Integrationsorts in das Plastidengenom, die Proteinakkumulation und die Modifikation des Lipoproteins mit Palmitinsäure positiv zu beeinflussen. Die erzeugten Pflanzen sollten in dieser Arbeit hinsichtlich der Proteinakkumulation und posttranskriptionalen Modifikation des rekombinanten Proteins untersucht werden. Zusätzlich sollte das immunogene Potential von rpOspA nach oraler Applikation im Tierversuch bestimmt werden.

Darüber hinaus sollte die für eine Lipidierung minimale Aminosäuresequenz mithilfe eines Reportergeren-Systems ermittelt werden. Die Konstrukte des Reportergeren-Systems kodierten für YFP in Fusion mit unterschiedlich langen Variationen der bakteriellen Signalsequenz von OspA und waren im Rahmen einer Diplomarbeit zur Transformation von *N. tabacum* verwendet worden, so dass transgene Pflanzen zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung standen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun das Lipidierungspotential der verschiedenen Signalsequenzen untersucht werden. Dazu sollte mithilfe der Eigenfluoreszenz des YFP eine visuelle Lokalisation des Reporterproteins in Abhängigkeit der unterschiedlichen Signalsequenzen erfolgen und dadurch Rückschlüsse auf das Vorliegen eines Lipidrests gezogen werden.

2. Die Verwendung endogener Signalsequenzen ist oft mit einem positiven Einfluss auf Transkription und Modifikation rekombinanter Proteine verbunden. Da über den Prozess der Lipidierungen in Chloroplasten wenig bekannt ist und rekombinantes OspA in den Organellen nicht korrekt modifiziert wurde, sollte der Einfluss potentieller endogener Signalsequenzen auf die Lipidmodifikation des bakteriellen Proteins OspA untersucht werden. Dafür wurden putative Signalsequenzen von drei membranständigen plastidären Proteinen zur Fusion mit OspA ohne N-terminaler Signalsequenz verwendet. Generierte transplastome Pflanzenlinien sollten hinsichtlich der Lipidmodifikation des rekombinanten Proteins untersucht werden. Mit den erzeugten Konstrukten sollte darüber hinaus Einblick in die Maschinerie des Lipidierungsapparates der Chloroplasten erhalten werden.
3. Da unterschiedliche Zellkompartimente über eine divergierende Ausstattung an Enzymen verfügen, resultieren Unterschiede in der Expression und Translation identischer Transgene in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzenzelle. Der

Einfluss variierender Signalsequenzen auf Lipidmodifikation und Proteinakkumulation nach einer Expression im Zellkern sollte mithilfe eines transienten Expressionssystems untersucht werden. Dabei sollten auch Unterschiede bezüglich der posttranslationalen Modifikation im Vergleich zur Expression in den Chloroplasten dargelegt werden. Wie im Falle der transplastomen Pflanzen sollte auch für die transiente Expression ein Reportergen-System zur schnellen visuellen Detektion dienen. Zusammenfassend sollte das Potential eines transienten Expressionssystems zur Produktion rekombinanter Lipoproteine ermittelt und ein geeignetes Zellkompartiment zur Synthese bakterieller Lipoproteine in Pflanzen gefunden werden.

Durch die gegebene Fragestellung sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Optimierung der Produktion eines rekombinanten Lipoproteins in transgenen Pflanzen erfolgen. Dabei sollten außerdem Einblicke in die Lipidierungsmaschinerie pflanzlicher Zellen insbesondere der Chloroplasten erhalten und Einflüsse variabler bakterieller Signalsequenzen bei Expression im Zellkern und in den Chloroplasten untersucht werden. Damit sollte ein Beitrag zum Verständnis geleistet werden, inwieweit Pflanzen zur Produktion bakterieller Lipoproteine fähig sind und als Produktionsplattform lipidierter Proteine herangezogen werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Gebräuchliche Chemikalien wurden von den Herstellern Applichem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Verwendete Enzyme und entsprechende Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

#### Besondere Chemikalien

[9, 10- <sup>3</sup> H] Palmitinsäure	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Acrylamid/Bisacrylamid 37%	Applichem (Darmstadt)
Agarose	Applichem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Amplify-Lösung	GE Healthcare (München)
Bacto-Trypton	Applichem (Darmstadt)
Bacto-Agar	BaccaraRose (Sonsbeck)
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt)
CDP-Star	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cetyltrimethylammonium Bromid (CTAB)	Applichem (Darmstadt)
(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-	
1-propansulfonat (CHAPS)	Applichem (Darmstadt)
D4-Nikotin	Campro Scientific (Berlin)
Dithiothreitol (DTT)	Applichem (Darmstadt)



## 2. Material und Methoden

---

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Glycerin, wasserfrei	Applichem (Darmstadt)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Applichem (Darmstadt)
Iodacetamid	Merck (Darmstadt)
IPG-Puffer (pH 3-10)	GE Healthcare (München)
Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	Applichem (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosine	Applichem (Darmstadt)
peqGold TriFast™	Peqlab (Erlangen)
Phenylmethylsulphonyl Fluorid (PMSF)	Sigma (Deisenhofen)
Serdolit MB-1	Serva (Heidelberg)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Applichem (Darmstadt)
N,N,N',N'-Di-(dimethylamino)ethan (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Thioharnstoff	Merck (Darmstadt)

### **Besondere Enzyme**

Cellulase R10	Duchefa (Haarlem, NL)
Macerozym R10	Duchefa (Haarlem, NL)
RNase	Applichem (Darmstadt)
Trypsin	Promega (Mannheim)

### **Antibiotika**

Ampicillin	Applichem (Darmstadt)
Carbenicillin	Duchefa (Haarlem, NL)
Gentamycin	Duchefa (Haarlem, NL)
Kanamycin	Applichem (Darmstadt)
Rifampicin	Applichem (Darmstadt)
Spectinomycin	Duchefa (Haarlem, NL)

### **Pflanzenhormone**

6-Benzylaminopurin (BAP)	Duchefa (Haarlem, NL)
1-Naphtylelessigsäure (NAA)	Duchefa (Haarlem, NL)
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Fluka (Neu-Ulm)

### **Antikörper**

Maus anti-OspA M492912	Fitzgerald (Concord, USA)
Maus anti-GFP	SantaCruz (Heidelberg)
Ziege anti-Maus-HRP-konjugiert	SantaCruz (Heidelberg)

### Verbrauchsmaterialien

1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Desoxynukleotide	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Fuji medical X-Ray Film	Hartenstein (Würzburg)
Goldpartikel (Micron Gold 0.6 µm)	BioRad (München)
Hybond-P PVDF-Membran	Amersham (Freiburg)
Hyperfilm™ MP	Amersham (Freiburg)
Nylonmembran (porablott NY plus)	Machery-Nagel (Düren)
Prestained Proteinmarker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Protino® Ni-TED Resin	Machery-Nagel (Düren)
Rupturedisc	BioRad (München)
Spritzen zum Infiltrieren, 1 ml	Hartenstein (Würzburg)
Sterilfilter, 0.2 µm	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen)
Tris-Glycin-Gel, 4-12%	Applichem (Darmstadt)
Whatmanpapier	Hartenstein (Würzburg)

### Kits

2D Quant Assay	GE Healthcare (München)
Cheluminate-HRP Pico Detection Kit	Applichem (Darmstadt)
Midiprep-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Nucleospin Extract II Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Roche DIG Labeling Kit	Roche Diagnostics (München)

### **Laborgeräte und Zubehör**

Agarose-Geldokumentation	Gel ix imager, Intas (Göttingen)
Autoklav	VX-95, Systec (Wettenberg)
Autoradiographiekassetten	Intas (Göttingen)
Gefriertrocknung	ALPHA 2-4 LDplus, Christ (Osterode)
Genegun	BioRad PDS-1000/he Biolistic, BioRad (München)
Hybridisierungsöfen	Hybridizer HB-1000, LTF Labortechnik (Wasserburg)
Magnetrührer	RCT basic, IKA Labortechnik (Staufen)
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab (Erlangen)
PCR-Geräte	PCR Authorized Thermal Cycler, Eppendorf (Hamburg), Primus 25, Peqlab (Erlangen)
Photometer	Infinite2000, Tecan (Crailsheim)
Schüttler	Shaker Dos-10L, Neolab (Heidelberg)
SDS-Gel-Apparatur	Cast-It S, Peqlab (Erlangen)
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1080 Rotor TST 41.14, Kontron Instruments (Watford, GB)
Waagen	Atilon Acculab, Neolab (Heidelberg)
Wärmeschränke	Heraeus, Roth (Karlsruhe)

Wasserbad	Köttermann Labortechnik (Hänigsen)
Western-Blot-Apparatur	Peqlab (Erlangen)
Zentrifugen	Eppendorf 5417R, Eppendorf 5804R, Eppendorf (Hamburg)

### **Material zur Kultivierung von Pflanzen**

Magenta-Boxen	Magenta Corporation (Chicago, USA)
Kulturgefäße (0.25 – 1 L)	Weck GmbH & Co. KG (Wehr)

### **Steriles Material**

Die Sterilisation von Flüssigkeiten und Puffern erfolgte im Autoklav bei einer Temperatur von 121°C für 20 Minuten. Die Sterilisation von Verbrauchsmaterial erfolgte in einem Trockenschrank bei 120°C für 30 Minuten für Plastikmaterialien bzw. bei 160°C für 8 Stunden für Glasgegenstände. Hitzeempfindliche Lösungen konnten durch Sterilfiltration in einen keimfreien Zustand gebracht werden.

## **2.2 Nährmedien**

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):	10 g/L Bacto-Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl pH 7 bei Festmedien zusätzlich 13.6 g/L Bacto-Agar
-----------------------------------	--

RMOP-Medium (Regeneration Medium of Plants): 4.3 g/L MS-Salze  
30 g/L Saccharose  
0.1 g/L Myo-Inositol  
1 ml/L BAP (100 mg/ml)  
0.1 ml/L NAA (100 mg/ml)  
pH 5.8  
4.3 g/L Bacto-Agar

MS-Medium: 4.3 g/L MS-Salze  
30 g/L Saccharose  
0.1 g/L Myo-Inositol  
1 ml/L B5 Vitamine  
pH 5.7

Die Medien wurden nach der Herstellung bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und vor dem Gießen mit den entsprechenden Antibiotika versehen.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml
Gentamycin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml
Spectinomycin	200 µg/ml für Bakterienmedien und 500 µg/ml für Pflanzenmedien

Nährlösung für Tabak:	5 ml/L $\text{KNO}_3$ (1 M)
	1 ml/L $\text{CaCl}_2$ (1 M)
	1 ml/L $\text{MgSO}_4$ (1 M)
	0.5 ml/L FeEDTA (50 mM)
	1.5 ml/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (2:1;1 M)
	0.5 ml/L Spuren
	pH 6.2

Spuren:	46.3 mM $\text{H}_3\text{BO}_3$
	9.14 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	0.8 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	0.32 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	0.12 $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

Die Nährlösung wurde in sterile Kulturgefäße gefüllt und bei einer Temperatur von 121°C für 20 Minuten autoklaviert.

### 2.3 Genmaterial, Plasmide und Proteine

#### Klonierungsvektoren

##### pCR-blunt (Invitrogen, Karlsruhe)

Als Subklonierungsvektor von PCR-Produkten, die mittels *Pfu*-Polymerase erzeugt wurden, diente der 3.5 kb große Vektor pCR-blunt. Dieser Vektor ist zur Klonierung von DNA mit blunt-ends konzipiert und trägt zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen.

##### pKG27 (Glenz, 2005)

Der Chloroplastenklonierungsvektor pKG27 (5.4 kb) ist ein Abkömmling des pJS25uidA-Vektors (Staub & Maliga, 1993) und enthält das bakterielle *uidA*-Gen aus *E. coli*, das von

den plastidären regulatorischen Elementen 3'-*psbA*-UTR und 5'-*psbA*-UTR flankiert ist. Durch Insertion in Vektor pKG27 werden die zu untersuchenden Gene mit den regulatorischen Elementen des *psbA*-Gens versehen. Eine Verkürzung der 3'-*psbA*-Region soll dabei unerwünschte homologe Rekombinationen vermeiden und eine stabile Integration der Expressionskassette garantieren (Glenz, 2005).

### **Chloroplastenexpressionsvektoren**

#### pRB95, pRB96 (Ruf et al., 2001)

Zur Expression der Transgene im Chloroplastengenom wurden die Vektoren pRB95 (7.6 kb) und pRB96 (8.6 kb) verwendet. Diese tragen zur Selektion das Spectinomycin-Resistenzgen *aadA* unter der Kontrolle des *rrn*-Promoters und des *psbA*-Terminators. Direkt strangaufwärts des Spectinomycin-Resistenzgens befindet sich die multiple Klonierungsstelle (MKS). Diese wird von den plastidären Genen *psaB*, *rps14*, *trnfM* und *trnG*, *ycf9*, *trnS* flankiert, durch die mittels homologer Rekombination eine gerichtete Integration in das Plastidengenom gewährleistet wird. Im Unterschied zu pRB95 steht die Expressionskassette nach Insertion in den Vektor pRB96 unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente 5'-*atpI* (*PatpI*) und 3'-*rps16* (*Trps16*).

### **Vektoren zur transienten Expression (ICON Genetics, Halle/Saale)**

Zur transienten Expression der Transgene in *Nicotiana benthamiana* wurde das System der Firma ICON Genetics verwendet.

#### pICH10990

Der Vektor pICH10990 kodiert für das 3'-Modul mit der darin enthaltenen MKS zum Einbringen gewünschter Inserts. Strangabwärts der MKS liegt der *nos*-Terminator. Zur Rekombination mit einem 5'-Modul befindet sich strangaufwärts der MKS eine Rekombinationsstelle. Als Selektionsmarker trägt der Vektor ein Carbenicillin-Resistenzgen.

#### pICH11599

Vektor pICH11599 stellt ein weiteres 3'-Pro-Vektor-Modul des ICON-Systems dar. Im Gegensatz zu Vektor pICH10990 kann die Insertion gewünschter Transgene in die multiple



Klonierungsstelle mit den Restriktionsschnittstellen von *NcoI* und *XbaI* erfolgen. Zur Selektion trägt der Vektor ein Carbenicillin-Resistenzgen.

### pICH7410

Vektor pICH7410 stellt ein 3'-Pro-Vektor-Modul dar, das als Insert *gfp* enthält und zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit des ICON-Systems dient. Zur Selektion trägt Vektor pICH7410 ein Carbenicillin-Resistenzgen.

### pICH15879

Vektor pICH15879 kodiert für ein 5'-Modul des Expressionssystems. Dieses steht unter der Kontrolle des Arabidopsis Aktin 2 Promoters PAtACT2 und kodiert neben einer Polymerase zusätzlich für ein Movement-Protein, das zur Verteilung der entstehenden RNA in der Pflanze dient. Zur Selektion trägt der Vektor ein Carbenicillin-Resistenzgen.

### pICH20030

Der Vektor pICH20030 stellt ebenfalls ein 5'-Pro-Vektor-Modul dar. Im Gegensatz zu pICH15879 verfügt er zusätzlich strangaufwärts der Rekombinationsstelle über eine künstliche Dicotyledonen-Chloroplasten-Targeting-Sequenz. Zur Selektion trägt der Vektor ein Carbenicillin-Resistenzgen.

### pICH10881

Der Vektor pICH10881 kodiert für das Rekombinationsmodul, das nach der Translation im Cytosol über ein Signalpeptid in den Zellkern geleitet wird. Dort erkennt die Rekombinase die Rekombinationsstellen AttP und AttB von 5'- und 3'-Modul und kann diese zu einem transkribierbaren Amplikon verknüpfen. Zur Selektion trägt dieser Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen.

### **Genmaterial**

#### ospa

Das Genmaterial zur Klonierung der *ospa*-Konstrukte stammte aus den Plasmiden pKG27OspA und pNT2OspA (Glenz, 2005) beziehungsweise aus den Plasmiden pOA4413 und pOT4413 (Hennig, 2006), die in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen.

#### yfp

Als Matrize zur Erzeugung von YFP-Konstrukten wurde der Vektor pYFP4413 verwendet (Hennig, 2006).

### **Nukleotidsequenzen**

Nukleotidsequenzen zur Klonierung und Amplifikation ausgewählter Gensequenzen wurden von der Firma Metabion (Martinsried) und Operon (Köln) bezogen und lagen in einer Konzentration von 200 pmol/µl vor. Die in der Arbeit verwendeten Primer und ihre Nukleotidsequenzen sind Tabelle 2.1 zu entnehmen.

### **Proteine**

#### OspA

Gereinigtes OspA, das rekombinant in *E. coli* synthetisiert worden war, wurde von Prof. Markus Simon (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

#### YFP

Gereinigtes YFP stand in Form der Variante YFP22 zur Verfügung. Das Protein wurde nach transienter Expression aus infiltriertem Blattmaterial von *Nicotiana benthamiana* mittels Ni-Affinitätschromatographie isoliert.

**Tabelle 2.1. Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide.**

Primername	Primersequenz 5'-3'
OA126	AATTGCTCTCAAGGTAATGCAAAATATTATTGGGAATAGGTC
OA128	AATTGCTCTCAAGGTATGGCCTTAATAGCATGTAAG
OA211	TGCTCGAGTTTTAAAGCGTTTTTAATTCATCAAG
OAdeltaC	TACCTAGGCAAAATATTTATTGGGAATAGGTCTAATATTAGCCTTAATAGCAG GTAAGC
OAhis rev	ATTTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTTAAAGCGTTTTTAATTC
OAfor Ncol	TTACCATGGAAAAATATTTATTGGGAAGAGG
OT112	TTCCATGGAATAAGATCTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGACG
Lip131	CATGGTAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGCGTAGCTGTGTACA
Lip132	CATGGGAATTCATTTATTTCTCTCAGGGGTGGCTTGCTTTGGTA
Lip133	CATGGTATCCGTCTTTGGTTTCATTGCTTGTTGTTTTGTCA
Lip231	GATCTGTAACAAGCTACGCCAAGTAAGAAGTGTAGAACAATTAC
Lip232	GATCTACCAAAGCAAGCCACCCCTGAGAGAAATAAATGAATTCC
Lip233	GATCTGACAAAACAACAAGCAATGAAACCAAAGACGGATAC
YFP105	ATCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Y1.1 rev	AGTTTCTAGAGAGCTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTGACAGCTCGTC CATGC
M13 for	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGA

### 2.4 Bakterien

***Escherichia coli*** (Invitrogen, Karlsruhe). Zur Vervielfältigung rekombinanter Plasmide wurden Zellen von *Escherichia coli* Stamm TOP 10 verwendet. Die Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert und auf LB-Medium, das mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen von *E. coli* wurden schüttelnd bei 37°C und 250 rpm angezogen.

***Agrobacterium tumefaciens*** (DSMZ, Braunschweig). Zur transienten Expression wurden Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 mit den entsprechenden Vektoren der Firma ICON Genetics transformiert. Die Zellen wurden in LB-Medium mit Rifampicin und Gentamycin bei 28°C kultiviert. Je nach verwendetem Plasmid wurde dem Nährmedium zusätzlich Kanamycin oder Carbenicillin zur Selektion zugefügt.

### 2.5 Pflanzen

***Nicotiana tabacum***. Zur stabilen Chloroplastentransformation wurden ca. 6-10 Wochen alte Wildtyp-Pflanzen von *Nicotiana tabacum* des Kultivars Petit-Havana verwendet. Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen bei Dauerlicht und 26°C kultiviert, bevor sie zur Transformation mittels Genegun verwendet wurden.

***Nicotiana benthamiana***. Zur transienten Expression mittels Agrobakterien wurden Wildtyp-Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* verwendet. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen im Versuchsgewächshaus des botanischen Gartens der TU Darmstadt kultiviert und vor der Blüte zur Infiltration mit Agrobakterien verwendet.

***Solanum lycopersicum***. Für die Pfropfungen von Tabak auf Tomatensprosse wurden Wildtyp-Samen von *Solanum lycopersicum* TA 234 ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

### 2.6 Methoden

#### 2.6.1 Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material

##### 2.6.1.1 Steriles Ausbringen von Samen

Zur Erzeugung steriler Pflanzen wurden Samen von WT- oder transgenen Pflanzen in einer Sterilisationslösung für 20 Minuten inkubiert. Die Samen wurden danach unter sterilen Bedingungen viermal mit sterilem Wasser gewaschen und zur Keimung auf MS-Platten, die gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika versehen waren, ausgebracht. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und unter Dauerlicht und 26°C inkubiert. Nach der Keimung konnten die Pflanzen zu Versuchszwecken geerntet oder auf Erde ausgebracht werden. Zur weiteren Kultivierung unter sterilen Bedingungen erfolgte der Transfer der Keimlinge in sterile Magenta-Boxen oder Kulturgefäße.

Sterilisationslösung: H<sub>2</sub>O steril, 1.5% Natriumhypochlorit, 1% Tween 20

##### 2.6.1.2 Kultivierung von Pflanzen

Die Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte bei Langtagbedingungen (14 Stunden Licht, 10 Stunden Nacht) bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C. Pflanzen, die zunächst unter Zellkulturbedingungen gewachsen waren, wurden die ersten Tage im Gewächshaus zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit unter einer lichtdurchlässigen Haube kultiviert.

Die Kultivierung von Pflanzen in der Zellkultur erfolgte bei Dauerlicht und einer konstanten Temperatur von 26°C.

##### 2.6.1.3 Pfropfen von Tabak auf Tomatensprosse

Zur Reduktion des Nikotingehalts von Tabakpflanzen wurden diese auf WT-Tomatensprosse gepfropft. Die Samen von WT-Tomatenpflanzen und transgenem Tabak beziehungsweise WT-Tabak wurden auf Erde ausgebracht und unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Zum Pfropfen wurden ca. 8-12 Wochen alte Pflanzen mit vergleichbar stark ausgeprägten Sprossachsen verwendet. Dafür wurde die Triebspitze der Tomatenpflanzen mit einem sauberen Schnitt entfernt. Sprosse der Tabakpflanzen wurden in Höhe vergleichbarer

Sprossstärke isoliert und auf die Sprossachse der Tomate aufgebracht. Der Kontaktpunkt beider Sprossachsen wurde mit einem ca. 1 cm breiten Gummiband fixiert und durch regelmäßige Kontrollen überprüft. Die gepfropften Pflanzen wurden bis zum Verwachsen der beiden Sprossachsen im Gewächshaus kultiviert. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen unter eine lichtdurchlässige Haube gestellt und regelmäßig mit Wasser besprüht. Nach Verwachsen der Sprossachsen wurde der Gummiring entfernt und die Pflanzen unter Gewächshausbedingungen bis zur Ernte kultiviert.

### 2.6.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.6.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen der DNA erkennen und an diesen Stellen die Phosphatverbindungen im Rückgrat der DNA lösen. Dadurch können gewünschte Gensegmente gezielt aus der DNA isoliert werden. Die beim Verdau entstehenden Enden, sogenannte sticky ends oder blunt ends, haben eine hohe Affinität zueinander, so dass bei einer Ligation Fragmente mit komplementären Schnittstellen wieder zusammengefügt werden können.

##### Reaktionsansatz

DNA	1-10 µg
Restriktionsenzym	1-2 Units/µg
10x Reaktionspuffer	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Zur Beseitigung von RNA-Kontaminationen konnte dem Ansatz zusätzlich 1 µl RNase zugefügt werden. Diese wurde in gefriergetrockneter Form bezogen und nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Der Restriktionsansatz wurde für zwei Stunden bei der dem Restriktionsenzym entsprechenden Temperatur inkubiert. Für einen Doppelverdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde das Ansatzvolumen auf 20 µl erhöht.

### 2.6.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der bei einem Restriktionsverdau entstehenden DNA-Fragmente wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde die Agarose in 1× TAE-Puffer gelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Zur Erhöhung der Dichte wurden die Proben vor dem Beladen des Gels mit 6× Ladepuffer versehen. Die Elektrophorese erfolgte in 1× TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 Volt. Anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und ihre Größe anhand eines DNA-Leiters bestimmt werden. Zur weiteren Klonierung wurden die entsprechenden Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem Extraktionskit NucleoSpin entsprechend der Anleitung des Herstellers aus der Agarose-Matrix isoliert.

6× Ladepuffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.03% Bromphenolblau, 60% Glycerol,  
60 mM EDTA

50× TAE-Puffer: 242 g Tris-Base, 54.5 g Eisessig, 18.5 g Na-EDTA,  
pH 8.18 – 8.29 mit HCl

### 2.6.2.3 DNA-Ligation

Ligasen sind Enzyme, die unter ATP-Verbrauch DNA-3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden verbinden. Dadurch können Fragmente und Vektoren, die komplementäre Schnittstellenenden aufweisen miteinander kombiniert werden. Das Resultat dieser Reaktion stellen neue, rekombinante Plasmide dar.

Ligationsansatz:

Insert-DNA	0.5-1 µg
Linearisierter Vektor	0.2 µg
10× Ligationspuffer	1 µl
T4 DNA-Ligase	1 Unit/µg
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 14 °C über Nacht inkubiert und schließlich zur Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

### 2.6.2.4 Transformation von Bakterienzellen

Zur Expression generierter Plasmide war die Transformation von Bakterienzellen notwendig. Dafür wurden 50 µl Aliquots bereits kompetenter Zellen von *Escherichia coli* verwendet. Der Ligationsansatz wurde zu den Bakterien pipettiert und diese anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 50 Sekunden. Nachdem die Zellen mit 500 µl LB-Medium versetzt worden waren, wurden sie schüttelnd bei 37°C für eine Stunde inkubiert und im Anschluss auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Zur Transformation von Agrobakterien wurden 200 µl Aliquots kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* verwendet und mit 0.5-1 µg isoliertem Plasmid aus *E. coli* versehen. Zunächst wurden die Zellen für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgten 5 Minuten Inkubation in flüssigem Stickstoff und 5 Minuten bei 37°C. Nach Zugabe des LB-Mediums wurden die Zellen schüttelnd bei 28°C für 4 Stunden inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden drei bis fünf Tage bei 28°C inkubiert.

### 2.6.2.5 PCR-Colony-Screen

Bei einer PCR (Polymerase Chain Reaction) werden bestimmte DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer selektiv amplifiziert. Diese Methode kann zur Identifikation transgener Bakterienkolonien verwendet werden.

Für ein Colony-Screen wurden die zu untersuchenden Bakterienkolonien in 20 µl Wasser suspendiert. Von dieser Suspension dienten 10 µl als Matrize für die PCR. Im Falle positiver Kolonien konnten die verbliebenen 10 µl zum Beimpfen flüssiger LB-Medien verwendet werden.

Da Annealingtemperatur und Elongationszeit primer- beziehungsweise templatespezifisch sind, konnte die Annealingtemperatur je nach verwendeten Primern variieren. Die Elongationszeit wurde mit einer Minute pro 800 Basenpaaren zu amplifizierendes Insert angesetzt.

10× Reaktionspuffer: 100 mM Tris-Cl, pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Triton X-100



### PCR-Ansatz:

Bakteriensuspension	10 µl
10× Reaktionspuffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.6 µl
25 mM dNTPs	1.6 µl
10 mM Primer forward	0.2 µl
10 mM Primer reverse	0.2 µl
Taq Polymerase	1-2 Units
Wasser	ad 20 µl

### Zeit-Temperatur-Programm

<u>Erste Denaturierung</u>	5 min	94°C	
Denaturierung	45 s	94°C	
Annealing	45 s	53°C	3 Zyklen
<u>Elongation</u>	1 min	72°C	
Denaturierung	30 s	94°C	
Annealing	30 s	55°C	30 Zyklen
<u>Elongation</u>	1 min	72°C	
Finale Elongation	5 min	72°C	

### 2.6.2.6 Amplifikation von Nukleotidsequenzen

Neben der schnellen Identifikation rekombinanter Bakterienkolonien wurde das Prinzip der PCR auch zur Generierung und Amplifikation neuer Nukleotidsequenzen verwendet. Durch Modifikation der verwendeten Primer können dabei Sequenzvariationen vorgenommen werden oder alternative Schnittstellen in ein Gen eingefügt werden. Da bei der Amplifikation neuer Nukleotidsequenzen ein Basenaustausch vermieden werden muss, wurde auf die *Pfu*-

Polymerase zurückgegriffen. Diese zeichnet sich im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase durch eine hohe Lesegenauigkeit aus.

### PCR-Ansatz:

Template (Plasmid-DNA)	10-100 ng
10× Reaktionspuffer	5 µl
25 mM dNTPs	4 µl
10 mM Primer forward	1 µl
10 mM Primer reverse	1 µl
Pfu Polymerase	1-2 Units
Wasser	ad 50 µl

### Zeit-Temperatur-Programm

<u>Erste Denaturierung</u>	4 min	94°C	
Denaturierung	45 s	94°C	3 Zyklen
Annealing	1 min	53°C	
<u>Elongation</u>	1.5 min	72°C	
Denaturierung	30 s	94°C	30 Zyklen
Annealing	30 s	59°C	
<u>Elongation</u>	1.5 min	72°C	
Finale Elongation	5 min	72°C	

Da die *Pfu*-Polymerase keine Adenosin-Überhänge ihrer Amplifikate erzeugt, wurden die generierten Fragmente nach der Agarose-Gelelektrophorese zur Klonierung in den Vektor pCR-blunt (Kap. 2.3) verwendet.

### 2.6.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die alkalische Lyse (nach Birnboim & Doly, 1979) ist eine Methode zur Isolierung plasmidärer DNA aus Bakterienzellen. Dafür wurden 1.5–3 ml einer Übernachtskultur bei 10 000 rpm für eine Minute pelletiert und das Zellpellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II erfolgte die Lyse der Bakterienzellen und die Denaturierung der DNA im alkalischen Milieu. Danach wurde die Suspension mit 200 µl eiskalter Lösung III versetzt, invertiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit diesem Schritt wird eine Neutralisierung der Lösung bewirkt, wodurch neben Proteinen und Kalium-Dodecylsulfat auch die genomische DNA gefällt wird, während die plasmidäre DNA aufgrund ihrer Größe renaturiert und in Lösung bleibt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA folgte durch die Zugabe von 600 µl Isopropanol. Die Lösung wurde gevortext und 2 Minuten bei RT inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Minuten erfolgte die Präzipitation der DNA. Das DNA-Pellet wurde zuletzt mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA

Lösung II: 0.2 M NaOH, 1% SDS

Lösung III: 3 M KOAc

Größere DNA-Mengen, wie sie zur Chloroplastentransformation nötig waren, wurden mit dem Plasmid-Isolierungs-Kit der Firma Invitrogen nach Anleitung des Herstellers gewonnen.

### 2.6.2.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Da für die Chloroplastentransformation und die DNA/RNA-Blot-Analysen definierte Mengen an DNA beziehungsweise RNA eingesetzt werden, musste die Konzentration der Nukleinsäure-Präparationen bestimmt werden. Nukleinsäuren absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Eigenschaft wird bei der photometrischen Bestimmung der

Konzentration genutzt. Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration erfolgte mit dem Infinite M2000 und der NanoQuant Plate der Firma Tecan beziehungsweise dem ND-100 Spektrophotometer der Firma PqLab nach Angabe des Herstellers.

### 2.6.2.9 Langfristige Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Agrobakterien erfolgte auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika bei 4°C. Die Kulturen wurden zu diesem Zweck alle 10-14 Tage auf frische Platten umgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Um langfristig auf eine rekombinante Bakterienkultur von *E. coli* oder *A. tumefaciens* zurückgreifen zu können, wurden Dauerkulturen angelegt. Dafür wurden 300 µl Bakterienkultur mit 500 µl 50%igem, sterilen Glycerol versehen, auf niedriger Stufe gevortext, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Von diesen Kulturen ausgehend konnte nach Bedarf LB-Medium beimpft werden.

### 2.6.2.10 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Da für eine Transformation von Bakterien kompetente Zellen nötig sind, wurden Zellen von *E. coli* Stamm TOP10 durch eine Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> aufnahmefähig gemacht. Alle Schritte erfolgten dabei auf Eis beziehungsweise bei 4°C. Von einer Übernachtskultur wurden 50 ml bis zu einer OD von 0.5 kultiviert und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 3000× g pelletiert und in 15 ml TfB 1 resuspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss 90 Minuten auf Eis inkubiert und bei 3000× g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml TfB 2 resuspendiert und die Suspension zu 50 µl aliquotiert, bevor die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

TfB 1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol, pH 5.8

TfB 2: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol, pH 6.8 (KOH)

### 2.6.2.11 Herstellung kompetenter Agrobakterien

Wie bei der Transformation von *E. coli* sind bei der Transformation von Agrobakterien kompetente Zellen nötig. Auch hier wurden alle Arbeitsschritte, soweit nicht anders angegeben, auf Eis beziehungsweise bei 4°C ausgeführt. Von einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) wurden 1 ml zum Beimpfen von 100 ml LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde zwei bis vier Stunden bei 28°C schüttelnd inkubiert und anschließend zu je 50 ml bei 5000 rpm für 20 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml TE-Puffer aufgenommen und 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Zellen in 10 ml LB-Medium resuspendiert waren, wurden sie zu je 500 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4

### 2.6.2.12 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Nukleotidsequenzen wurden am Lehrstuhl für Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) an einem Li-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

## 2.6.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Analyse komplexer Proteingemische. Dabei polymerisieren Acrylamid und Bisacrylamid unter Anwesenheit freier Radikale zu einer feinporigen Matrix, durch die die Proteinprobe wandern muss. Das Auftrennungspotential der Gelmatrix wird dabei vom Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt, wobei die Größe der Poren mit steigendem Acrylamidanteil zunimmt (Maniatis et al., 1989). Die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) und ein Erhitzen der Probe führen zur Lösung von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen, so dass die Wandergeschwindigkeit der Polypeptide in der Polyacrylamidmatrix allein von ihrem Molekulargewicht bestimmt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gele basierten auf dem System von Laemmli (1970) mit Tris-Glycin-Puffern. Das Trenngel wurde einen Tag vor Gebrauch gegossen und mit Trenngelüberschichtungspuffer bei 4°C gelagert. Die Sammelgele wurden direkt vor Gebrauch gegossen und härteten mindestens 30 Minuten bei RT aus, bevor die Proben aufgetragen werden konnten.

<u>12.5%iges Trenngel</u>	Acrylamidlösung	2.4 ml
	Trenngelpuffer	1.4 ml
	10% SDS	56.3 µl
	Wasser	1.6 ml
	10% APS	28.3 µl
	TEMED	25 µl
<u>Sammelgel</u>	Acrylamidlösung	0.44 ml
	Sammelgelpuffer	0.83 ml
	10% SDS	33 µl
	Wasser	2 ml
	10% APS	25 µl
	TEMED	25 µl

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-Cl pH 8.8

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-Cl pH 6.8

Trenngelüberschichtungspuffer: 0.375 M Tris-Cl, 1% SDS, pH 8.8

### 2.6.3.2 Probenvorbereitung und Elektrophorese

Gereinigte Proteinproben oder Extrakte des löslichen Gesamtproteins wurden in einem Volumen von 20 µl verwendet. Zur Probe wurden 5 µl 5×SDS-Probenpuffer pipettiert und die Probe bei 95°C für 10 Minuten erhitzt. Von diesem Ansatz wurden 20 µl zur SDS-PAGE verwendet.

Für einen Gesamtproteinextrakt wurde 100 mg in Stickstoff gefrorenes Blattmaterial

pulverisiert, mit 100 µl 2×SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei RT unter maximaler Geschwindigkeit, bevor 20 µl des Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen wurden.

Als Größenstandard wurden 5 µl eines Proteinleiters aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 40 Volt für eine Stunde. Anschließend wurde die Spannung für die restliche Laufzeit auf 100 Volt erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

5×SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10% SDS, 0.5% Bromphenolblau,  
50% Glycerol

2×SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% Bromphenolblau,  
20% Glycerol

1×SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% (v/v) SDS

### 2.6.3.3 Proteinfärbung mittels Silbernitrat

Eine sensitive Methode zur Anfärbung von Proteinbanden im Acrylamidgel stellt die Färbung mit Silbernitrat dar. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt bei dieser Methode im Bereich von 0.5 bis 5 ng. Die Farbgebung beruht auf der Komplexbildung von Ag<sup>+</sup>-Ionen mit den Glu- beziehungsweise Asp- und Cys-Resten der Proteine und der anschließenden Reduktion von Ag<sup>+</sup> zu Ag durch die Anwesenheit von Formaldehyd. Die in dieser Arbeit durchgeführte Silberfärbung basierte auf der Methode von Blum *et al.* (1987). Hierfür wurden die Gele zunächst für mindestens 1 Stunde schüttelnd in Fixierlösung inkubiert und anschließend zweimal für 25 Minuten in 30%igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein Waschschrift für 25 Minuten in dd H<sub>2</sub>O bevor die Gele für 1 Minute in 0.02%iger Natriumthiosulfat-Lösung sensibilisiert wurden. Danach folgten drei Waschschriffe für 20 Sekunden in dd H<sub>2</sub>O. Anschließend inkubierten die Gele für 20 Minuten bei 4°C in einer 0.1%igen Silbernitratlösung. Die Entwicklung bis zum gewünschten Färbungsgrad erfolgte in der Entwicklungslösung und wurde durch eine Inkubation in 0.05 M EDTA-Lösung gestoppt.

Fixierlösung: 40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Entwicklungslösung: 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05% Formaldehyd

### 2.6.3.4 Immunoblot

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern mussten die Proteine zunächst auf einer PVDF-Membran immobilisiert werden. Der Transfer der Proteine aus den Acrylamidgelen auf die Membran erfolgte dafür in einer Tank-Blot-Apparatur bei einer Spannung von 100 Volt für eine Stunde. Im angelegten elektrischen Feld wandern die Proteine aus der Gelmatrix in Richtung Anode und werden auf der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Vor dem Transfer wurden die Gele zunächst für 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Eine Membran in der Größe des Gels wurde mit Methanol benetzt und anschließend ebenfalls in Transferpuffer equilibriert. In Richtung Kathode zu Anode wurde in folgender Reihenfolge luftblasenfrei ein Haltegitter und zwei Lagen Schaumstoff in die Apparatur geschichtet. Darauf folgten ein Whatmanpapier, das equilibrierte SDS-Gel und die Membran. Zum Abschluss folgten ein Whatmanpapier, zwei Schaumstoffkissen und ein Haltegitter. Nach dem Transfer der Proteine in Transferpuffer wurden im Anschluss unspezifische Bindungsstellen der Membran durch eine Inkubation in Magermilchlösung blockiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht, bevor am nächsten Tag die Membran zunächst mit dem Primärantikörper inkubiert werden konnte. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde rotierend bei RT in einer Verdünnung 1: 10 000 in 1× PBST. Die darauffolgende Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in einer Verdünnung 1:20 000 in 1× PBST rotierend bei RT für mindestens eine Stunde. Nach beiden Inkubationsschritten wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1× PBST gewaschen. Im Anschluss folgte die Detektion mit dem Enhanced Chemiluminate-HRP Pico Detection Kit nach Angaben des Herstellers. Die Membran wurde dafür mit einer Luminol-haltigen Lösung inkubiert. Da der verwendete Sekundärantikörper an eine Peroxidase gekoppelt war, wurde das Luminol in einen angeregten Zustand versetzt, bei dessen Zerfall Licht emittierte, das mittels eines Röntgenfilms detektiert werden konnte.

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol

1× PBST: 1×PBS, 0.05% Tween 20

10× PBS: 230 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 170 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7.2 - 7.4

Magermilchlösung: 5% (w/v) Magermilchpulver, 1× PBST



### 2.6.3.5 Herstellung von Extrakten des löslichen Gesamtproteins

Zur Herstellung von Extrakten des löslichen Gesamtproteins (LGP) wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und pulverisiert. Das Material wurde mit 200 µl Proteinextraktionspuffer versetzt und 20 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 2000× g. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, zur Beseitigung aller zellulären Bestandteile erneut zentrifugiert und stand im Anschluss der Quantifizierung des LGP mittels BCA Assay zur Verfügung.

Proteinextraktionspuffer: 1× PBST, 10mM PMSF

### 2.6.3.6 Reinigung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Gesamtprotein der transplastomen Pflanzen wurde nach der Methode von Wang *et al.* (2006) isoliert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten dabei bei 4°C, Lösungen und Puffer wurden eiskühlt verwendet. Für die Reinigung wurde 100 mg in flüssigem Stickstoff pulverisiertes Pflanzenmaterial zunächst mit 1 ml Lösung 1 gewaschen und bei 14 000× g für 3 Minuten zentrifugiert. Darauf folgte ein Waschschrift des Pellets mit 1 ml Lösung 2, bevor erneut zentrifugiert wurde. Nach einem dritten Waschschrift mit 80% (v/v) Aceton wurde wiederholt zentrifugiert und das erhaltene Pellet bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml Lösung 3 versetzt und bei 14 000× g für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt, mit 1 ml Lösung 2 versetzt und zur Fällung der Proteine über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 14 000× g für 3 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 80 % (v/v) Methanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Es folgte ein finaler Waschschrift mit 1 ml 80% (v/v) Aceton, bevor das Proteinpellet bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurde.

Lösung 1: 10% (v/v), 90% (v/v) Aceton

Lösung 2: 80% (v/v) Methanol, 0.1 M Ammoniumacetat

Lösung 3: 50% (v/v) Phenol pH 8, 50% (v/v) SDS-Puffer

SDS-Puffer: 30% (w/v) Saccharose, 2% (w/v) SDS, 0.1 M Tris-Cl, pH 8,  
5% (v/v) β-Mercaptoethanol

### 2.6.3.7 Proteinquantifizierung mittels BCA Protein Assay

Zur Quantifizierung der Konzentration des löslichen Gesamtproteins (LGP) von Blattextrakten wurde das *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* verwendet. Basis dieser Methode ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  in der Anwesenheit von Proteinen in einem alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion). Die reduzierten Kupfer-Ionen wiederum bilden mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelat-Komplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann und ein direktes Maß für die Proteinkonzentration in der Probe darstellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Microtiterplatten nach den Angaben des Herstellers.

### 2.6.3.8 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Separation komplexer Proteingemische. Dabei werden die Proteine in zwei Dimensionen aufgetrennt: Zunächst erfolgt eine Separation der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und im Anschluss die Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht. Für die 2D-Gelelektrophorese wurde isoliertes Gesamtprotein (Kap. 2.6.3.6) in 100 µl Rehydratisierungspuffer suspendiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Kit 2D Quant Assay nach Anleitung des Herstellers bestimmt und 200 µg Gesamtprotein in einem Volumen von 100 µl für die Analyse verwendet.

Rehydratisierungspuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% (w/v) CHAPS,  
2% (v/v) IPG-Puffer pH 3-10, 50 mM DTT,  
0.01% (w/v) Bromphenolblau

#### 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 24 cm lange IPG-Streifen (Ettan<sup>TM</sup> IPGphor<sup>TM</sup> II IEF System, GE Healthcare) mit einem nicht linearen pH-Gradienten von pH 3-10 verwendet. Die Streifen wurden vor der Fokussierung über Nacht in 450 µl Rehydratisierungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Streifen mit dd H<sub>2</sub>O gewaschen, in die Elektrophorese-Apparatur (Ettan<sup>TM</sup> IPGphor<sup>TM</sup> II IEF System, GE Healthcare) gelegt und am sauren Ende mit den vorbereiteten Proben beladen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei insgesamt 62 kWh (Tab. 2.2). Nach der Fokussierung

wurden die IPG-Streifen zunächst kurz in dd H<sub>2</sub>O inkubiert und die Cysteinreste der Proteine durch eine Inkubation der Streifen für 15 Minuten in Equilibrierungspuffer I reduziert. Danach folgte eine Inkubation der Streifen für 15 Minuten in Equilibrierungspuffer II, der zur Blockierung von freien SH-Gruppen Iodoacetamid enthielt. Die Streifen konnten nun zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet werden.

Rehydratisierungspuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% (w/v) CHAPS,  
2% (v/v) IPG-Puffer pH 3-10, 50 mM DTT,  
0.01% (w/v) Bromphenolblau

Equilibrierungspuffer I: 50 mM Tris-Cl pH 8.8; 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin,  
2% (w/v) SDS, 130 mM DTT. 0.002% (w/v) Bromphenolblau

Equilibrierungspuffer II: 50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M Harnstoff, 30% (w/v) Glycerin,  
2% (w/v) SDS, 280 mM Iodoacetamid,  
0.002% (w/v) Bromphenolblau

**Tabelle 2.2: Programm der isoelektrischen Fokussierung.**

Step and Voltage Method	U (V)	Dauer (h:min)	Vhrs
Step'n'Hold	150 V	2:00	300
Step'n'Hold	300 V	2:00	600
Gradient	500 V	2:00	~800
Gradient	1000 V	4:00	~3000
Gradient	4000 V	0:30	~1250
Step'n'Hold	4000 V	3:30	14 000
Step'n'Hold	5000 V	8:30	42 500
			Σ: ~ 62 450

### 2. Dimension: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 12.5%ige Gele und die Ettan Dalt™ Apparatur (GE Healthcare) verwendet. Die Gele wurden nach dem Gießen mit 2 ml Wasser-gesättigtem Butanol pro Gel übergossen und polymerisierten zwei Stunden aus. Danach wurde das Butanol entfernt und die Gele mit Kathodenpuffer überschichtet. Im Anschluss wurden die vorbereiteten IPG-Streifen der ersten Dimension auf die Gele gelegt und der Kathodenpuffer abgegossen. Zur Fixierung der IPG-Streifen wurde eine Schicht aus 0.5%iger Agaroselösung in Kathodenpuffer auf die IPG-Streifen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 Watt pro Gel für die ersten 30 Minuten und anschließend für vier Stunden bei 17 Watt pro Gel. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Farbstofffront ca. 1 cm von der Unterkante des Gels entfernt war. Die Gele wurden zuletzt aus der Apparatur entnommen und Proteine mittels Silberfärbung gefärbt (Kap. 2.6.3.3).

#### 12.5%iges Gel (V = 450 ml):

30% (v/v) Acrylamid	31.3 ml
1.5 M Tris-Cl pH 8.8	18.8 ml
dd H <sub>2</sub> O	23.3 ml
10% (w/v) SDS	0.75 ml
10% (w/v) APS	0.7 ml
10% (v/v) TEMED	0.1 ml

Anodenpuffer: 25 mM Tris-Base, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS

Kathodenpuffer: 50 mM Tris-Base, 0.384 M Glycin, 0.2% SDS

### 2.6.3.9 Image-Analyse von 2D-Gelen

Die Image-Analyse der gefärbten Gele wurde von Dr. Jörg Reinders, Institut für funktionelle Genomik, Universität Regensburg, durchgeführt. Dafür wurden die Gele mit Standard-Parametern gescannt und mit der Delta2D™ Software (Decodon, Greifswald) bearbeitet. Spots wurden als differentiell betrachtet, wenn sie sich mindestens um das 3-fache in ihrer Intensität unterschieden.

### 2.6.3.10 Probenvorbereitung zur LC-MS/MS-Analyse

Die Probenvorbereitung für die LC-MS/MS-Analyse erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Shevchenko *et al.* (1996). Differentielle Spots wurden aus dem Gel isoliert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Spots wurden abwechselnd zweimal für je 10 Minuten mit Lösung A bzw. Lösung B inkubiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Die dehydrierten Gelstücke wurden anschließend in einem geringen Volumen Trypsinlösung rehydratisiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Peptide durch eine Inkubation für 10 Minuten in 5%iger Ameisensäure extrahiert und standen schließlich der LC-MS/MS-Analyse zur Verfügung.

Lösung A: 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

Lösung B: 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50% (v/v) Acetonitril

Trypsinlösung: 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12.5 ng Trypsin/ $\mu\text{l}$  Lösung

### 2.6.3.11 LC-MS/MS-Analyse

Die massenspektrometrische Untersuchung der Proteine mittels nano-LC-MS/MS (nano-HPLC gekoppelte Tandemmassenspektrometrie) wurde von Dr. Jörg Reinders (Institut für funktionelle Genomik, Universität Regensburg) am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg an einem Ultimate™ 3000 Chromatography System (Dionex, Idstein), das an ein ESI-MS (Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer) gekoppelt war, durchgeführt. Dafür wurden die Proben zunächst auf einer 300 mm ID 1 mm  $\text{C}_{18}$  Vorsäule aufkonzentriert und die Peptide anschließend über eine an die Vorsäule gekoppelte 75  $\mu\text{m}$  ID  $\text{C}_{18}$  Trennsäule aufgetrennt. Die Elution erfolgte mittels eines binären Laufmittelgradienten, wobei der Anteil an Laufmittel B von 5% auf 95% in 55 Minuten erhöht wurde. Die Flussrate betrug 250 nl/Min. Die Peptide wurden direkt in die Ionenfalle (LCQ Deca XPplus™, Thermo Electron, Dreieich) gesprüht. Die Aufnahme der Tandemmassenspektren erfolgte bei einem Scan pro Sekunde. Die generierten Daten wurden mit MASCOT™ (Version 2.1, Matrix Science, London) bearbeitet und der Datenbankabgleich erfolgte mit SwissProt (Version 200, Geneva). Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als Modifikation festgelegt; zusätzlich wurden optional oxidiertes Methionin ausgewählt und tryptischer Verdau mit bis zu einer überlesenen Schnittstelle als

weitere Parameter für den Such-Algorithmus angegeben. Alle Spektren wurden zusätzlich manuell validiert. Eine Protein-Identifikation stützte sich hierbei auf die Identifikation von mindestens zwei unterschiedlichen Peptiden.

Laufmittel A: 0.1% Ameisensäure

Laufmittel B: 0.1% Ameisensäure, 84% Acetonitril

### 2.6.4 Methoden zur Transformation von Tabakpflanzen

#### 2.6.4.1 Stabile Chloroplastentransformation mittels Genegun

Zur biolistischen Transformation von Tabak-Chloroplasten wurde die Methode nach Sanford *et al.* (1987) angewandt. Diese beruht auf dem Prinzip, dass mit DNA beschichtete Mikropartikel mittels Überdruck in die Pflanzenzelle und die Plastiden eingebracht werden. Da die Expressionskassette von Bereichen flankiert wird, die homolog zu Bereichen des WT-Chloroplastengenoms sind, kann eine zielgerichtete Integration in das WT-Genom erfolgen. Zur Selektion beinhaltet die Expressionskassette ein Spectinomycin-Resistenzgen, dessen Genprodukt einen AMP-Rest auf Spectinomycin überführt und so die inhibitorische Wirkung des Antibiotikums auf die prokaryotische Transkriptionsmaschinerie hemmt (Svab & Maliga, 1993; Bock, 2001). Nach mehreren Runden unter Selektionsdruck sollten dadurch nicht-transformierte WT-Chloroplastengenome durch rekombinante plastidäre Genome verdrängt werden.

#### Präparation der Goldpartikel

Zur Präzipitation der DNA auf die Goldpartikel wurden alle Schritte bei 4°C oder auf Eis ausgeführt. Verwendete Lösungen wurden eisgekühlt verwendet. Zunächst wurden 2 mg Goldpartikel in 100 µl 100%igem EtOH suspendiert und 1 Minute gevortext. Die Suspension wurde dann 1 Sekunde bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Partikel in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Im Anschluss wurde für eine Sekunde bei 6000 rpm zentrifugiert und die vom wässrigen Überstand befreiten Partikel in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen. Nacheinander wurden zu der Suspension 25 µg DNA, 250 µl CaCl<sub>2</sub>

(2.5 M) und 50 µl Spermidin (0.1 M) pipettiert und nach jedem Schritt sofort gevortext. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten, wobei nach jeder Minute gevortext wurde. Nach einer Zentrifugation für 1 Sekunde bei 4000 rpm wurde der Überstand entfernt und die Partikel gewaschen. Dafür wurden die Goldpartikel in 600 µl 100%igem EtOH gründlich resuspendiert und bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Partikel schließlich in 65 µl 100%igem EtOH aufgenommen. Bis zu ihrer Verwendung wurde die Suspension auf Eis gelagert und unmittelbar vor Gebrauch gründlich resuspendiert.

### Beschuss der Tabakblätter mit der Genegun

Vor Arbeitsbeginn wurden alle verwendeten Materialien und Geräte autoklaviert oder mit 100%igem Isopropanol desinfiziert. Die Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Zunächst wurden die Macrocarrier in die Macrocarrierholder eingebaut und pro Schuss 6 µl der Goldpartikelsuspension mittig auf die Macrocarrier aufgetragen. Sterile Blätter von ca. sechs Wochen alten Pflanzen von *Nicotiana tabacum* wurden mit der Unterseite nach oben auf eine mit einem Filterpapier präparierte RMOP-Platte gelegt. Der Beschuss der Blätter erfolgte mit den Macrocarriern in der obersten Schiene und den Blättern in der dritten Ebene von oben. Nachdem ein Vakuum von 27 Inch Hg aufgebaut war, wurde ein Druck von 1100 psi generiert. Bei diesem Druck erfolgt das Reißen der Rupturediscs und der Beschuss des Blattes mit den Goldpartikeln. Beschossene Blätter wurden anschließend für zwei Tage bei 26°C unter Dauerlicht kultiviert und danach in ca. 35 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Diese wurden mit der Unterseite nach unten auf Spectinomycin-haltigen RMPO-Platten ausgelegt und alle ein bis zwei Wochen auf neue Platten umgesetzt. Entstehende Kalli wurden vom Muttergewebe entfernt und einzeln auf Spectinomycin-haltigen Platten kultiviert. Da erste generierte Pflanzen noch heteroplastisch sind, wurden sie mehreren Regenerationszyklen unterworfen. Dazu wurden Blattstücke der noch heteroplastischen Pflanzen auf Selektionsmedium zu neuen Pflanzen regeneriert. Nach zwei bis drei Runden Regeneration unter Selektionsdruck war ein homoplastischer Zustand erreicht und die Pflanzen konnten zur Bewurzelung auf MS-Medium gebracht werden.

### 2.6.4.2 Transiente Expression mittels Agrobakterien

Das in dieser Arbeit verwendete System zur transienten Expression der Firma ICON Genetics (Halle/Saale) beruht auf pflanzlichen viralen Vektoren, die mit Hilfe von Agrobakterien in die Pflanzenzelle eingebracht werden (Kap. 1.3.2). Zur Infiltration wurden 10 ml Bakterienkulturen, die mit den Pro-Vektor-Modulen kodierend für 5'-Modul, 3'-Modul und Rekombinase transformiert worden waren, bei 4000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 50 ml Icon-Puffer resuspendiert und die zur Infiltration benötigten Bakteriensuspensionen im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Diese Mischung diente schließlich der Infiltration von ca. acht Wochen alten Pflanzen von *Nicotiana benthamiana*. Die Proteinakkumulation konnte fünf bis zehn Tage nach der Infiltration mittels Immunodetektion oder Eigenfluoreszenz des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden.

Icon-Puffer: 10 mM MES, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### 2.6.5 Methoden zur Identifizierung transgener Pflanzen

#### 2.6.5.1 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Um eine Insertion einer gewünschten Gensequenz in das Pflanzengenom und damit eine erfolgreiche Transformation nachzuweisen, wurde Gesamt-DNA aus Blattmaterial transgener Pflanzen mittels Cetyltrimethylammonium Bromid (CTAB) isoliert. Dafür wurden 100-200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit je 750 µl DNA-Extraktionspuffer und Chloroform versehen. Die Proben wurden gevortext und eine Stunde bei 65°C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 7500× g für 10 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 750 µl 100%igem Isopropanol versetzt und bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Isolierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

DNA-Extraktionspuffer: 1% Sarcosyl, 0.8 M NaCl, 0.022 M EDTA, 0.22 M Tris-Cl, pH 7.8, 0.8% (w/v) CTAB, 0.14 M Mannitol



### 2.6.5.2 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Blattmaterial erfolgte mit dem TriFast Reagenz der Firma Peqlab. Dazu wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit 1 ml TriFast Reagenz versehen und gevortext. Danach wurden die Proben bei RT für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei RT erfolgte die Phasentrennung bei einer Zentrifugation bei 4°C und 12 000× g für 15 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt, mit 500 µl 100%igem Isopropanol versehen und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgte in der anschließenden Zentrifugation bei 12 000× g für 10 Minuten. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Nuklease-freiem Wasser suspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 2.6.5.3 Denaturierende Agarosegele

Denaturierende Agarosegele wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von isolierter RNA verwendet. Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Geräte vor Arbeitsbeginn für einige Stunden in einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Verwendete Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Zur Herstellung des denaturierenden Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1×FA-Puffer gelöst und anschließend mit 1.8 ml Formaldehyd (37%) und 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in 1×FA-Puffer für 30 Minuten equilibriert und vor dem Beladen für 5 Minuten einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Als Proben dienten 8 µg der isolierten RNA, die mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl eingestellt und mit 5 µl 5× RNA-Ladepuffer versetzt worden waren. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V in 1× FA-Puffer.

1× FA-Puffer: 20 mM Mops pH 7, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA

5× RNA-Ladepuffer: 40% (v/v) 10× FA-Puffer, 30.8% (v/v) Formamid, 20% (v/v)

Glycerin, 7.2% (v/v) Formaldehyd, 0.8% (v/v) EDTA, 0.16% (v/v)

Bromphenolblau-Lösung

### 2.6.5.4 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Zum Nachweis bestimmter Nukleotidsequenzen innerhalb der DNA transgener Pflanzen dienten mit Digoxigenin markierte Sonden. Die Basensequenz der Sonden ist komplementär zur Sequenz der zu untersuchenden Gene und kann deshalb mit diesen hybridisieren. Da die Guanosin-Oligonukleotide der Sonden an Digoxigenin-Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) gekoppelt sind, können sie über anti-Digoxigenin-Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Die Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte mit dem PCR DIG Labeling Mix der Firma Roche gemäß der Angabe des Herstellers. Die Sonden wurden nach der Herstellung zu je 1 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.6.5.5 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP-Analyse)

Mithilfe des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus kann die DNA transgener Pflanzen auf die korrekte Integration des Transgens in das WT-Genom untersucht und ein homoplastischer Zustand transplastomer Pflanzen detektiert werden. Bei einem Restriktionsverdau der genomischen DNA mit einem Restriktionsenzym entsteht eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Durch eine Hybridisierung mit einer der gewünschten Gensequenz komplementären Sonde (Kap. 2.6.5.4) kann das Transgen und dessen korrekter Einbau in das Genom nachgewiesen werden. Für die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse wurde zunächst genomische DNA der zu untersuchenden Pflanzen isoliert (Kap. 2.6.5.1) und mit der Restriktionsendonuklease *Dra*II für mindestens 14 Stunden bei 37°C verdaut.

#### Ansatz:

DNA	2 µg
<i>Dra</i> II	2 µl
10× Reaktionspuffer	3 µl
H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Nach dem Verdau folgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel. Um die anschließende Hybridisierung der DNA mit der Sonde zu ermöglichen, wurde die DNA durch Inkubation des Agarosegels für 30 Minuten in Lösung I denaturiert. Nach einer zweimaligen Inkubation des Gels zur Neutralisation in Lösung II für je 30 Minuten erfolgte die Equilibrierung in 10× SSC-Puffer für 10 Minuten. Im anschließenden DNA-Blot wurde die DNA aus dem Gel mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel auf ein mit 10× SSC getränktes Filterpapier gelegt, wobei die Enden des Filterpapiers in eine mit 10× SSC gefüllte Wanne ragten. Auf das Gel folgten die Nylonmembran, zwei Lagen Filterpapier und ein 10 cm hoher Stapel saugfähiges Papier. Zum Schluss wurde dieser Aufbau mit einem Gewicht beschwert. Die Transferzeit betrug mindestens 20 Stunden. Zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran wurde diese nach dem Transfer für zwei Stunden bei 80°C im Trockenschrank inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung konnte die Membran in Frischhaltefolie gewickelt bei 4°C gelagert werden.

Lösung I: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

Lösung II: 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4

10× SSC-Puffer: 1.5 M NaCl, 0.15 M Natriumcitrat

### 2.6.5.6 RNA-Blot

Der RNA-Blot dient der Detektion spezifischer mRNA und weist die Expression von Genen auf Ebene der Transkription nach. Wie beim DNA-Blot wurde die RNA nach der elektrophoretischen Auftrennung (Kap. 2.6.5.3) zunächst auf eine Nylonmembran transferiert. Aufbau des Blots und Transfer erfolgten dabei analog zum DNA-Blot (Kap. 2.6.5.5), wobei alle Geräte vor dem Aufbau über Nacht in 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert wurden, um eine Kontamination mit Nukleasen zu vermeiden. Nach dem Transfer erfolgte die kovalente Bindung der RNA an die Membran durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C im Trockenschrank. Anschließend wurde die Membran zur Visualisierung der RNA für 5 Minuten in RNA-Färbelösung inkubiert und unspezifische Hintergrundfärbung durch Waschen in dd H<sub>2</sub>O entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt bei 4°C gelagert.

RNA-Färbelösung: 0.3 M NaAc, 0.25% Methylenblau, pH 5.2

### 2.6.5.7 Hybridisierung mit DIG-dUTP markierten Sonden

Für eine Hybridisierung der auf der Membran immobilisierten DNA/RNA mit einer DIG-dUTP markierten Sonde mussten zunächst unspezifische Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Dies geschah durch eine Inkubation der Membran im Hybridisierungssofen für zwei Stunden in 10 ml DIG Easy Hyb bei 42°C für DNA beziehungsweise 50°C für RNA. Im Anschluss an diese Prähybridisierung erfolgte die eigentliche Hybridisierung mit der DIG-dUTP markierten Sonde (Kap.2.6.5.4). Dafür wurde 1 µl der Sonde mit 100 µl DIG Easy Hyb versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die nun denaturierte Sonde wurde zur Membran pipettiert und diese über Nacht bei entsprechender Temperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst dreimal für 15 Minuten auf dem Schüttler in Lösung I und danach dreimal für 15 Minuten im Hybridisierungssofen bei 62°C in Lösung II gewaschen. Es folgte eine Equilibrierung der Membran für 5 Minuten in DIG-Waschpuffer. Durch eine anschließende Inkubation der Membran in DIG-Blockierungslösung für eine Stunde bei RT im Hybridisierungssofen konnten unspezifische Bindungsstellen des Antikörperfragments blockiert werden. Die Blockierungslösung wurde schließlich mit 1 µl des Anti-Digoxigenin-Antikörperfragments versetzt und weitere 30 Minuten inkubiert, bevor die Membran zweimal für 15 Minuten auf dem Schüttler in DIG-Waschpuffer gewaschen wurde. Nach einer Inkubation für 5 Minuten in Detektionspuffer folgte die Inkubation in einer Lösung bestehend aus 10 µl CDP-Star und 990 µl Detektionspuffer. Die Detektion erfolgte für 5 bis 60 Minuten unter Auflegen eines Röntgenfilms.

Lösung I: 2×SSC, 0.1% SDS

Lösung II: 0.5×SSC, 0.1% SDS

DIG-Waschpuffer: 100 ml 10× Maleinsäurepuffer, 900 ml H<sub>2</sub>O, 3 ml Tween 20

DIG-Blockierungslösung: 1 ml 10× DIG Blocking Solution (Roche, Mannheim),  
1 ml 10× Maleinsäurepuffer, 8 ml H<sub>2</sub>O

10× Maleinsäurepuffer: 1.5 M NaCl, 1 M Maleinsäure, pH 7.4

### 2.6.6 Methoden zur Charakterisierung transgener Pflanzen

#### 2.6.6.1 Isolierung von Thylakoidmembranen

Zur Untersuchung der Assoziation der rekombinanten Proteine an bestimmten Membrankompartimenten innerhalb der Chloroplasten wurden die Thylakoidmembranen transplastomer Pflanzen isoliert. Dazu wurde in Anlehnung an die Methode von Machold & Meister (1979) vorgegangen: Von 6.5 g Blattmaterial wurde die Mittelrippe entfernt und das Material in Streifen geschnitten. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt und Puffer eisgekühlt verwendet. Das Blattmaterial wurde zunächst mit 45 ml Puffer A in einem Mörser homogenisiert und durch 2 Lagen Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde bei 1400× g für 8 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Pellet anschließend zweimal mit Puffer B gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für 8 Minuten bei 3000× g zentrifugiert. Schließlich wurde das Membranpellet in 6 ml Puffer C unter Verwendung eines Homogenisators resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde mit 4 ml Puffer D überschichtet und bei 140 000× g für 45 Minuten zentrifugiert. Dabei reicherten sich die Thylakoidmembranen an der Phasengrenze an und konnten schließlich mit einer Pipette abgenommen werden. Isolierte Thylakoide wurden noch einmal mit Puffer B gewaschen und bei 48 000× g für 10 Minuten pelletiert. Zur Aufbewahrung wurde das Thylakoidpellet in 2 ml Lagerungspuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Puffer A: 400 mM Saccharose, 50 mM Tricin/NaOH pH 7.9, 200 mM NaCl

Puffer B: 25 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 10 mM EDTA

Puffer C: 900 mM Saccharose, 25 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 5 mM EDTA

Puffer D: 930 mM Saccharose, 25 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5 mM EDTA

Lagerungspuffer: 65 mM Tris/HCl pH 7.8, 10% (v/v) Glycin, 5 mM DDT

#### 2.6.6.2 Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten

Zum Nachweis der *in vivo*-Inkorporation radioaktiver Palmitinsäure rekombinanter Proteine war eine Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten aus dem Pflanzenmaterial notwendig. Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Treuter *et al.* (1993). Pro Konstrukt wurden Blätter mit einer Fläche von ca. 20 cm<sup>2</sup> von der Mittelrippe befreit und die Blattoberseite mit einem Skalpell vielfach eingeschnitten. Die so präparierten Blätter wurden

mit der Blattunterseite nach oben in eine Petrischale gelegt, mit 20 ml Enzymlösung bedeckt und über Nacht unter Lichtabschluss bei 26°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Protoplasten durch Schwenken der Petrischale aus der Blattstruktur gelöst werden. Die Suspension wurde durch eine Schicht Miracloth in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Intakte Protoplasten bildeten nach einigen Minuten eine flotierende Schicht, die mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Protoplasten wurden mit W5-Puffer gewaschen und bei geringer Beschleunigung kurz zentrifugiert. Das Protoplastenpellet wurde in 300 µl MSTM-Puffer aufgenommen und 200 µl davon zur *in vivo*-Inkorporation mit [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure verwendet. Die verbleibenden 100 µl der Protoplastensuspension konnten zum Nachweis des rekombinanten Proteins mittels Immunoblot verwendet werden.

Enzymlösung: 25 mg Cellulase, 10 mg Macerozym, MSTS-Puffer ad 10 ml

MSTS-Puffer: 4.41 g MS-Salze, 20 µl 2,4-D (1 mg/ml in EtOH), 1 g MES,  
136.9 g Saccharose, H<sub>2</sub>O ad 1000 ml, pH 5.7 mit NaOH

W5-Puffer: 18.4 g CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 9 g NaCl, 0.4 g KCl, 1 g Glucose,  
0.1 g MES, H<sub>2</sub>O ad 1000 ml, pH 5.8

MSTM-Puffer: 4.41 g MS-Salze, 20 µl 2,4-D (1 mg/ml in EtOH), 1 g MES,  
30 g Saccharose, 73 g Mannitol, pH 5.7 mit NaOH

### 2.6.6.3. *In vivo*-Inkorporation von [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure

Zur *in vivo*-Isotopenmarkierung wurden 200 µl der isolierten und in MSTM-Puffer aufgenommenen Protoplasten verwendet. Pro Experiment wurden 200 µCi [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure verwendet. Da diese in EtOH gelöst vorlag, wurde das entsprechende Volumen unter dem Abzug abgeblasen und der Rückstand in 2 µl DMSO und 8 µl MSTM pro Experiment aufgenommen. Von der Palmitinsäurelösung wurden 10 µl zu den isolierten Protoplasten gegeben und diese für 2.5 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Zur Lyse wurden die Protoplasten bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen mit 250 µl Lysispuffer versetzt. Zelluläre Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei maximaler Beschleunigung für 2 Minuten gefällt und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Die selektive Aufreinigung der rekombinanten und mit einem His-Tag versehenen Proteine aus dem Protoplasten-Lysat erfolgte mittels IMAC-Methode (Immobilized Metal Ion

Affinity Chromatography). Dazu wurde der wässrige Überstand mit 20 mg Protino® Ni-TED Resin versetzt und für 5 Minuten unter Agitation inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 Minute bei 500× g wurde das Material dreimal für 5 Minuten auf dem Schüttler mit 160 µl LEW-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde erneut zentrifugiert. Zur Elution wurde das Material mit 20 µl 2× SDS-Probenpuffer versetzt und bei 80°C für 5 Minuten erhitzt. Nach einer letzten Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten konnte der Überstand auf ein 4-12%iges Tris-Glycin Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte in 1× SDS-Laufpuffer bei 120 Volt für zwei Stunden. Danach wurden die Gele zunächst für 30 Minuten in Fixierlösung schüttelnd inkubiert und anschließend weitere 30 Minuten in Verstärkerlösung inkubiert. Zuletzt wurden die Gele auf einer Schicht Whatmanpapier bei 70°C – 80°C unter Vakuum für 1.5 Stunden getrocknet. Nachdem ein Röntgenfilm aufgelegt worden war, lagerten die Gele in einer Gelkassette für zwei bis sechs Wochen bei -80°C, bevor die Filme in der Dunkelkammer entwickelt werden konnten.

Lysispuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8 mit NaOH,  
1% Triton X-100

LEW-Puffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8 mit NaOH

Fixierlösung: 25% Isopropanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v),  
65% Wasser (v/v)

### 2.6.6.4 Analyse des Gehalts löslicher Zucker

Zur Untersuchung des Gehalts an löslichen Kohlenhydraten wurden Extrakte des Blattmaterials erzeugt und diese mittels PAD (Pulsed Ampereometric Detection) analysiert. Zur Herstellung der Zuckerextrakte wurde 1 g Blattmaterial von Pflanzen, die drei bis vier Tage auf Erde kultiviert worden waren, in flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend in einem Reagenzglas mit 4 ml Wasser versetzt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, bevor der wässrige Überstand in ein vorgeheiztes Reagiergefäß überführt wurde. Dieser wurde bei 105°C für 3 Minuten erhitzt und im Anschluss erneut zentrifugiert. Von diesem Rohextrakt wurde eine wässrige Verdünnung im Verhältnis 1:10 erstellt. Zur Bindung unerwünschter Aminosäuren im Extrakt, die ähnliche Retentionszeiten besitzen wie die zu untersuchenden Zucker, wurden die Verdünnungen mit Serdolit-MB1 Harz behandelt. Dafür wurde pro 100 µl Lösung 10 mg des Harzes zur Probe gegeben und der Ansatz für 30 Sekunden gevortext.

Die Analyse der wässrigen Überstände wurde von Frau Eva Wirth am Lehrstuhl für Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg durchgeführt. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung über isokratische Ionenchromatographie mittels PAD an einem Dionex 4500i Ionenchromatographen (Dionex, Idstein) durchgeführt. Als externer Standard diente eine wässrige Lösung, die die Zucker Saccharose, Fruktose, Glukose und den Zuckeralkohol Mannitol jeweils in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  enthielt und vor der Applikation ebenfalls mit Serdolit-MB1 Harz behandelt worden war.

### 2.6.6.5 Messung der Chlorophyllfluoreszenz mittels PAM-Fluorometer

Die Photosyntheseaktivität transplastomer Pflanzen wurde mittels eines PAM-Fluorometers (Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer; Walz, Effeltrich) untersucht. Die Messungen zur Photosyntheseaktivität wurden von Dr. Katharina Bonfig am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Julius-von-Sachs-Instituts für Biowissenschaften in Würzburg durchgeführt.

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde an drei unabhängigen Pflanzen der Linien OA13 und OA14 durchgeführt. Die Messungen erfolgten täglich, nachdem die Pflanzen von MS-Medium auf Erde transferiert worden waren. Zur Untersuchung des Vitalitätsverlustes in Abhängigkeit der Lichtverhältnisse wurde je eine Pflanze pro Linie nach dem Transfer auf Erde entweder unter Starklichtbedingungen im Gewächshaus oder unter Schwachlichtbedingungen im Labor kultiviert.

Folgende technische Spezifikationen des PAM-Fluorometers waren gegeben:

Zwölf Luxeon 3W Royal Blue LEDs (Peakwellenlänge bei 450 nm, Emissionsfilter bei 470 nm) generierten Messlicht, aktinisches Licht und Sättigungspulse. Das Licht für die Absorbtivitätsmessungen wurde von vier Rot-LEDs (Peakwellenlänge bei 650 nm) und von vier NIR-LEDs (Peakwellenlänge bei 780 nm) erzeugt. Die Intensität des Messlichtes am Objekt betrug maximal 0.4  $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$ , die des aktinischen Lichtes maximal 1570  $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$ . Die Intensität der Sättigungspulse lag bei maximal 3000  $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$ . Die technischen Daten der CCD-Kamera waren mit 10-Bit-Modus und 30 Frames/s eingestellt, wobei der zugehörige CCD-Chip eine Auflösung von 640  $\times$  480 Pixel hatte. Gemessen wurde eine Fläche von maximal 17  $\times$  22 mm, wobei der Abstand von Objekt und Objektiv mit 39 mm festgelegt war. Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde ein Langpassfilter mit einer Kante bei 645 nm verwendet.



Die Messung der aktuellen Fluoreszenz ( $F_t$ ) erfolgte kontinuierlich. In der Abwesenheit von aktinischem Licht und in Verbindung mit einem Sättigungspuls wurde zunächst die minimale Fluoreszenz ( $F_t = F_o$ ) und anschließend die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) des dunkel-adaptierten Blattes gemessen. Daraus konnte automatisch mithilfe der ImagingWin Software (Walz, Effeltrich) die maximale Quantenausbeute des PS II ( $F_v/F_m$ ) berechnet werden. Diese liegt bei nicht gestressten Pflanzen bei einem Wert von etwa 0.83 (Björkman & Demmig, 1987); ein Wert kleiner als 0.83 gilt als Indikator für die Schädigung des PS II.

In der Anwesenheit eines aktinischen Lichtes konnte anschließend die aktuelle Fluoreszenz ( $F_t = F$ ) bestimmt werden sowie die maximale Fluoreszenz ( $F_m'$ ) des lichtadaptierten Blattes. Davon ausgehend konnte die effektive Quantenausbeute PS II [ $Y(II) = (F_m' - F_t)/F_m' = \Delta F/F_m'$ ] berechnet werden. Diese stellt ein Maß für die Effektivität der Reaktionszentren von PS II dar. Die Bildgebung erfolgte mithilfe eines Falschfarbensystems, das eine Skala von 0.000 (schwarz) bis 1.000 (violett) aufwies.

### 2.6.6.6 Mikroskopische Bildgebung am CLSM

Untersuchungen zur Lokalisation des Reporterproteins YFP innerhalb der Pflanzenzelle erfolgten an einem konfokalen Mikroskop (Leica, TCS SP), das mit einem 63× Wasser-Immersions-Objektiv (plan apo, N.A. 1.2.) ausgestattet war. Die Anregungswellenlänge von 488 nm wurde von einem 25 mW Argon-Ionen-Laser generiert. Die Detektion der Fluoreszenz von GFP/YFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 500-540 nm. Die Bildgebung wurde mittels der Leica Confocal Software 2.00 (LCS, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) gewährleistet.

Für die Mikroskopie wurden zunächst intakte Protoplasten der zu untersuchenden Pflanzen wie unter Kapitel 2.6.6.2 beschrieben isoliert und in MSTM-Puffer verwendet.

### 2.6.6.7 Bestimmung des Nikotingehalts mittels GC-MS-Analyse

Zur Analyse des Nikotingehalts wurden 100 mg pulverisiertes und gefriergetrocknetes Blattmaterial von gepfropften Pflanzen beziehungsweise 15 mg Material ungepfropfter Pflanzen mit 1 ml 25%igem Methanol versetzt. Die Proben wurden mit 500 ng D4-Nikotin als interner Standard versehen und 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Kugelmühle homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 14 000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand abgenommen und mit 150 µl 5 N  $NH_3$  versetzt. Die Proben wurden zweimal

gegen 500 µl Diethylether ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und mit etwas Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wasserfrei getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend abgeblasen und der Rückstand in 25-100 µl Hexan aufgenommen. Die Analyse der Proben mittels GC-MS wurde unter der Leitung von Dr. Markus Krischke am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Julius-von-Sachs-Instituts in Würzburg an einem Trace GC ultra (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), das an ein DSQ-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gekoppelt war, durchgeführt. Zur Analyse wurden 2 µl der in Hexan gelösten Probe injiziert. Die Auftrennung der Proben erfolgte an einer Zebtron ZB-5-Säule (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg). Als Trägergas diente Helium bei einer Flußrate von 1 ml/Min. Der Temperaturgradient startete isotherm für 3 Minuten bei 80°C und endete bei einer finalen Temperatur von 300°C für 5 Minuten. Die Heizrate betrug 20°C/Min. Die Aufnahme der Daten erfolgte mittels chemischer Ionisierung (CI) und Methan als Reaktandgas bei einer Flußrate von 2.5 ml/Min. Der Scan-Bereich wurde bei einem m/z (Masse-Ladungsverhältnis) von 50 -250 festgelegt. Die generierten Daten wurden schließlich mit der Xcalibur Software (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bearbeitet.

### 2.6.7 Methoden der immunologischen Untersuchungen

#### 2.6.7.1 Herstellung von Blattextrakten

Zur Untersuchung des immunogenen Potentials der in Tabak rekombinant erzeugten Proteine wurden Extrakte von gepropftem Pflanzenmaterial erstellt.

Geerntetes Blattmaterial gepropfter Pflanzen wurde schockgefroren und in flüssigem Stickstoff pulverisiert, bevor es unter Vakuum gefriergetrocknet wurde. Von 1.2 g des gefriergetrockneten Materials wurde ein Extrakt hergestellt. Dazu wurde das Pflanzenmaterial mit 40 ml Extraktionspuffer versetzt und für 15 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 9000 rpm für 5 Minuten wurde die Suspension durch eine Lage Mull filtriert. Der wässrige Extrakt konnte nach der Gefriertrocknung als Trockenextrakt für die immunologischen Studien an Mäuse verfüttert werden.

Extraktionspuffer: 50mM Na-Ascorbat, 0.01% Tween 20

### 2.6.7.2 Immunologische Untersuchungen an Mäusen

Initiale Experimente zum immunologischen Potential von oral appliziertem OspA-Pflanzenmaterial wurden von Prof. Markus Simon am Max-Planck-Institut für Immunbiologie der Universität Freiburg an BALB/c-Mäusen durchgeführt. Für die Versuche standen zwei Versuchstiergruppen mit je drei Individuen zur Verfügung. Die Immunisierung erfolgte mit gefriergetrocknetem OA12-Pflanzenmaterial (Gruppe 1) entsprechend einem OspA-Gehalt von 5 µg in 500 µl PBS-Puffer und mit 5 µg gereinigtem, rekombinantem OspA aus *E. coli* (Gruppe 2) per Schlundsonde. Die Immunisierungen wurden viermal im Abstand von 7 Tagen durchgeführt (Tag 0, 7, 14, 29, 67, 69, 88, 89, 90, 120, 121 und 122); die Blutungen erfolgten an den Tagen 22, 36, 77, 99 und 130. Die Kontrollgruppe bestand aus zwei Versuchstieren, die an den Tagen 0, 7, 14, 29 und 88 mit 5 µg gereinigtem, rekombinantem OspA aus *E. coli* in 100 µl PBS-Puffer durch subkutane Applikation in die Schwanzwurzel immunisiert wurden. Die Blutung der Kontrollgruppe fand an den Tagen 22, 36 und 99 statt. Die Bestimmung der spezifischen OspA-Antikörper erfolgte mittels „solid-phase“-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Kramer et al., 1990).

Weitere Fütterungsexperimente der immunologischen Studie wurden von Professor Sam Telford (Tufts University School of Veterinary Medicine, Grafton, USA) an Mäusen der Spezies *Peromyscus leucopus* durchgeführt. Für die Experimente standen drei Gruppen von *P. leucopus* zur Verfügung, die mit gefriergetrockneten Extrakten gepropfter Pflanzen der Linien OA12, OT12 und WT gefüttert wurden. Jede Gruppe setzte sich dabei aus drei Versuchstieren zusammen. Die Verabreichung von gefriergetrockneten Pflanzenextrakten entsprechend dem Gehalt von 5 µg OspA erfolgte an den Tagen 0, 10 und 20 mittels Schlundsonde. Tieren der Kontrollgruppe (WT) wurde eine vergleichbare Menge WT-Extrakt verabreicht. Die Bestimmung einer Antikörperakkumulation im Blut der Versuchstiere erfolgte an den Tagen 28 und 110 mit der Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Zur Durchführung des ELISAs wurde ein Zelllysate des *B. burgdorferi* Stammes N40 in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet sowie anti-Maus-Ig (alle Isoformen) als sekundärer Antikörper, der zur Detektion mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war.

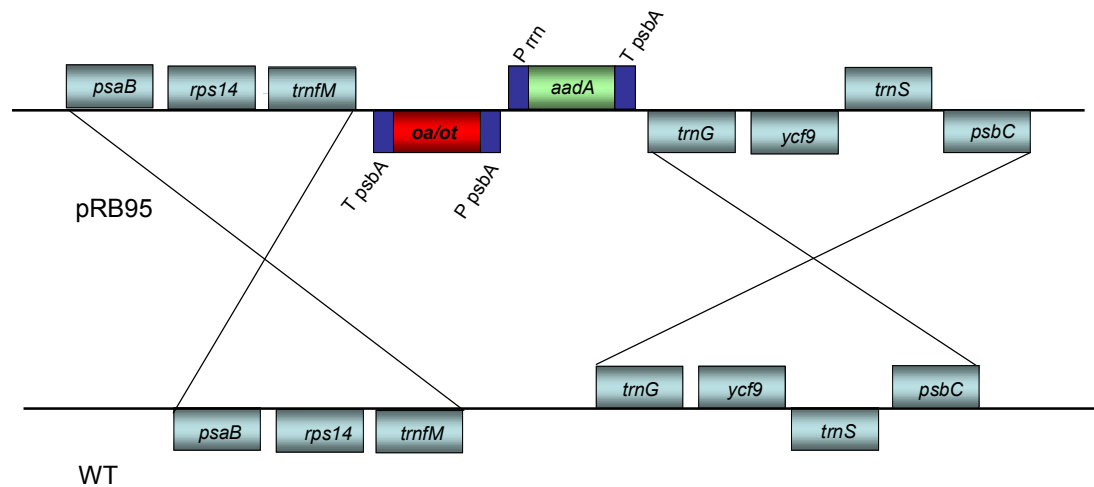
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Transplastome Pflanzen

Seit im Jahre 1988 erstmals das Chloroplastengenom der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* mittels Partikel-Bombardement transformiert werden konnte (Boynton et al., 1988), wurden zahlreiche Proteine in den Plastiden unterschiedlicher Pflanzen exprimiert (Bock & Warzecha, 2010). Zu diesen rekombinanten plastidären Proteinen zählen eine Reihe pharmazeutisch relevanter Moleküle, wie auch das bakterielle Oberflächenprotein OspA von *B. burgdorferi* (Glenz et al., 2006).

#### 3.1.1 Expression von rpOspA: Untersuchung des Einflusses variabler Signalsequenzen auf Lipidierung und Proteinakkumulation

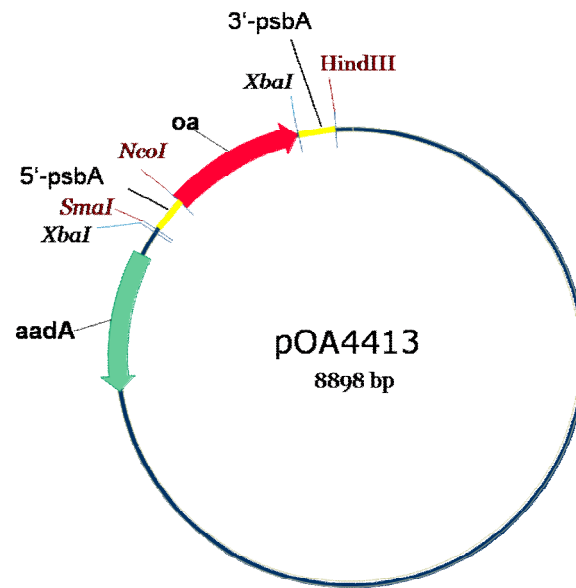
Die Expression einer Volllänge-sequenz (*oa12*) von OspA in Chloroplasten von *N. tabacum* führte zur Akkumulation eines lipidierten Proteins von 1% des LGP (Glenz, 2005). Untersuchungen der Lipidmodifikation ergaben die Anheftung eines Dipalmitylglycerols ohne Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz, so dass die Lipidmodifikation im Chloroplasten einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur entsprach. Da im Hinblick auf Pflanzen als Produktionsplattform rekombinanter Proteine eine möglichst hohe Syntheserate erstrebenswert ist und die Lipidierung einen essentiellen Faktor für die Immunogenität von OspA darstellt (Erdile et al., 1993; Weis et al., 1994), waren im Rahmen einer Diplomarbeit (Hennig, 2006) vier neue Varianten von OspA kloniert und zur Transformation des Chloroplastengenoms von *N. tabacum* mittels Genegun verwendet worden. Ziel dabei war, durch gezielte Aminosäuresubstitution innerhalb der N-terminalen Signalsequenz sowohl die Art der Lipidmodifikation als auch die Expressionsrate zu optimieren. Die Erhöhung der Expressionsrate sollte zudem durch die Wahl des alternativen Chloroplastenexpressionsvektors pRB95 erzielt werden, durch den die Integration der Expressionskassette in das Chloroplastengenom zwischen den plastidären Genen *trnfM* und *trnG* erfolgt (Abb. 3.1) und nachweislich zu einer hohen Proteinakkumulationsrate führt (Oey et al., 2009; Ruf et al., 2001).



**Abbildung 3.1. Schematische Darstellung zur homologen Rekombination.** Unter Verwendung von Vektor pRB95 erfolgt die Integration des Transgens (*oa* bzw. *ot*; rot unterlegt) und des für die Spectinomycin-Resistenz kodierenden *aadA*-Gens (grün unterlegt) durch doppelte homologe Rekombination zwischen die plastidären Gene *trnG* und *trnM* des WT-Plastidengenoms. Die Transkription der Gene über der angegebenen Linie erfolgt von links nach rechts; bei Genen unter der Linie von rechts nach links.

Im Chloroplastenexpressionsvektor pRB95 befindet sich strangabwärts der Expressionskassette, die unter Kontrolle der regulatorischen Elemente 3'-*psbA* und 5'-*psbA* steht, das für Spectinomycin-Resistenz kodierende *aadA*-Gen (Aminoglycosid-3"-Adenyltransferase-Gen; Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Dieses steht unter der Kontrolle des Promoters *Prrn* und des Terminators *TpsbA*.

Die zur Erzeugung transplastomer Pflanzen verwendeten Konstrukte kodierten für ein OspA mit unterschiedlichen N-terminalen Signalsequenzen (= OspA-Varianten; Tab. 3.1). Nukleotidsequenzen waren zunächst *oa13* und *oa14*. Diese Sequenzen entsprachen weitestgehend der Originalsequenz von *ospa*, bedingten jedoch einzelne Aminosäuresubstitutionen innerhalb der N-terminalen Signalsequenz des Proteins. Für Variante OA13 bedeutete dies den Austausch der Aminosäure Lysin an Position 2 nach dem Startmethionin durch Glutaminsäure. Bei Variante OA14 wurde die Aminosäure an Position 2 hingegen durch Alanin ersetzt. Außerdem lag für Variante OA14 die Substitution der für eine Lipidierung in prokaryotischen Zellen essentiellen Aminosäure Cystein an Position +1 durch Glycin vor.



**Abbildung 3.2. Vektorkarte des zur Chloroplastentransformation verwendeten Expressionsvektors.** Exemplarisch für die erzeugten Konstrukte steht der Vektor pOA4413. Eingezeichnet sind Transgen (*oa*; rot), regulatorische Elemente des Transgens (3'- und 5'-*psbA*; gelb), Resistenzgen (*aadA*; türkis) sowie für die Klonierung essentielle Restriktionsschnittstellen.

Erfolgt die Anheftung der Fettsäurereste im Chloroplasten mit einer Lipidierungsmaschinerie ähnlich der prokaryotischer Zellen, sollte eine Lipidierung von Variante OA14 nicht möglich sein.

Zusätzlich wurden zwei Varianten, die für ein *OspA* mit verkürzter Signalsequenz kodierten, generiert. Dies waren Varianten OT12 und OT13. Im Vergleich zur Form OT11, die bei der Synthese im Chloroplasten nicht lipidiert wurde (Glenz, 2005), war bei diesen beiden Varianten eine Aminosäure zwischen konserviertem Cystein und dem Startmethionin eingefügt. Im Falle von OT12 ergab sich daraus die Aminosäureabfolge MGCK, welche als Lipidierungssignal in eukaryotischen Zellen bekannt ist (Smotrys & Linder, 2004) und dort zu einer Palmitoylierung führt. Für Variante OT13 wurde Alanin als zweite Aminosäure nach dem Startmethionin eingefügt. Durch diese Aminosäuresubstitution sollte der Einfluss N-terminaler Aminosäuren auf die Expressionsrate überprüft werden.

**Tabelle 3.1. N-terminale Signalsequenzen der OspA-Varianten.** Angegeben sind die N-terminalen Signalsequenzen sowie die C-terminalen Sequenzen der zur stabilen Chloroplastentransformation verwendeten OspA-Konstrukte. Zum Vergleich dazu sind die Originalsequenz von OspA und die Sequenzen der Varianten OA12 und OT11 (Glenz et al., 2006) angegeben. Das Cystein an Position +1 innerhalb der Signalsequenz ist fett hervorgehoben.

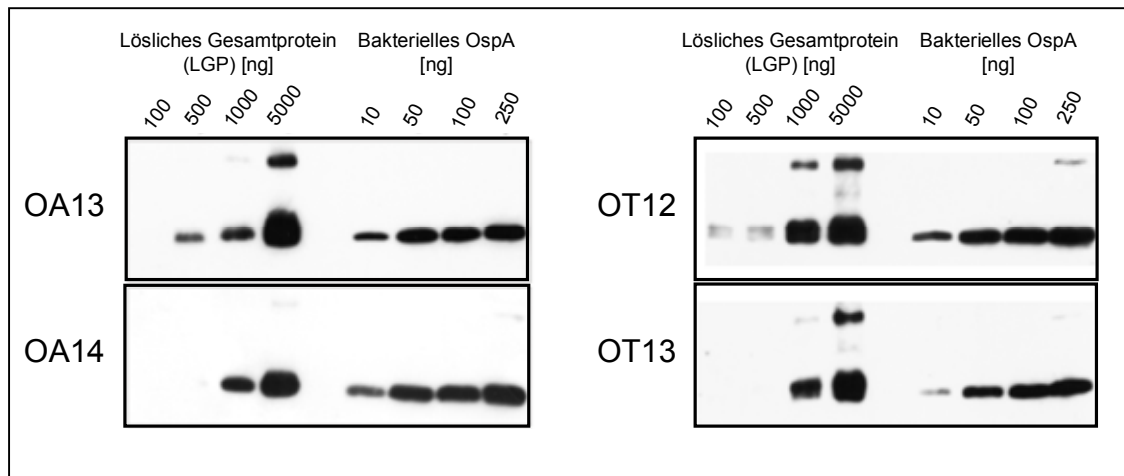
Konstrukt	N-Terminus	C-Terminus
OspA	M <b>K</b> KYLLGIGLILALI <b>A</b> CK...	....LK*
OA12	MEKYLLGIGLILALI <b>A</b> CK...	....LKSMERHHHHHH*
OT11	M <b>C</b> K...	....LK*
OA13	MEKYLLGIGLILALI <b>A</b> CK...	....LKHHHHHH*
OA14	MAKYLLGIGLILALI <b>A</b> IGK...	....LKHHHHHH*
OT12	M <b>G</b> CK...	....LKHHHHHH*
OT13	M <b>A</b> CK...	....LKHHHHHH*

Alle vier neuen OspA-Konstrukte wiesen einen His-Tag an ihrem C-terminalen Ende auf, mit dessen Hilfe eine selektive Aufreinigung der Proteine aus dem Pflanzenmaterial ermöglicht werden sollte.

Die beschriebenen Konstrukte der OspA-Varianten waren im Vorfeld im Rahmen der Diplomarbeit kloniert und zur Transformation von *Nicotiana tabacum* mittels Genegun verwendet worden (Hennig, 2006), so dass zu Beginn dieser Arbeit bereits homoplastische Kulturen der vier neuen OspA-Varianten auf RMOP-Medium zur Verfügung standen. Zur Bewurzelung wurden homoplastische Linien auf MS-Medium transferiert. Phänotypisch unterschieden sich diese jungen Pflanzen der neuen OspA-Varianten nicht von OA12-, OT11- oder WT-Tabakpflanzen. Die Pflanzen wuchsen zunächst unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur auf MS-Medium bis zu einer Größe von ca. 15 cm und standen ersten Untersuchungen zur Verfügung.

### 3.1.1.1 Proteinakkumulation

Zur Untersuchung der Proteinsyntheserate der homoplastischen OspA-Pflanzen wurde eine semiquantitative Methode angewandt. Dafür wurde ein Blattextrakt erstellt und das lösliche Gesamtprotein (LGP) mittels BCA Assay bestimmt. Definierte Mengen des LGPs wurden im Anschluss zusammen mit unterschiedlichen Mengen an gereinigtem rekombinantem, bakteriellem OspA (rbOspA) aus *E. coli* elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion von OspA mittels monoklonalem anti-OspA-Primärantikörper (Maus-anti-OspA) und einer anschließenden Inkubation mit einem gegen den IgG-Teil des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus). Da die Signalstärke auf der Membran mit der Menge an detektiertem Protein korreliert, konnte durch Vergleich der Bandenintensität die Menge an rpOspA im LGP der transplastomen Pflanzen semiquantitativ bestimmt werden. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung (Abb. 3.3) zeigten, dass die Intensität der Bande von 100 ng gereinigtem OspA mit der Intensität der Bande von 1000 ng löslichem Gesamtprotein der Linien OA13 und OA14 vergleichbar war. Dies entspricht einem Gehalt von 10% OspA am LGP transplastomer Pflanzen, die *ospa* mit Volllänge-sequenz exprimieren. Für die beiden Linien OT12 und OT13 konnte die Intensität der Banden von 1000 ng LGP und 250 ng rbOspA annähernd gleichgesetzt werden. Damit erhöhte sich die OspA-Akkumulation von OspA mit verkürzter Signalsequenz der Linien OT12 und OT13 auf 20% bis 25% des LGP.



**Abbildung 3.3. Semiquantitative Proteinbestimmung der Linien OA13, OA14, OT12 und OT13.**

Aufgetragen sind definierte Mengen des löslichen Gesamtproteins (LGP) transplastomer OspA-Pflanzen und definierte Mengen von gereinigtem rbOspA aus *E. coli*. Die im Immunoblot detektierten Banden entsprechen einer relativen Molekülmasse von  $31 \times 10^3$ .



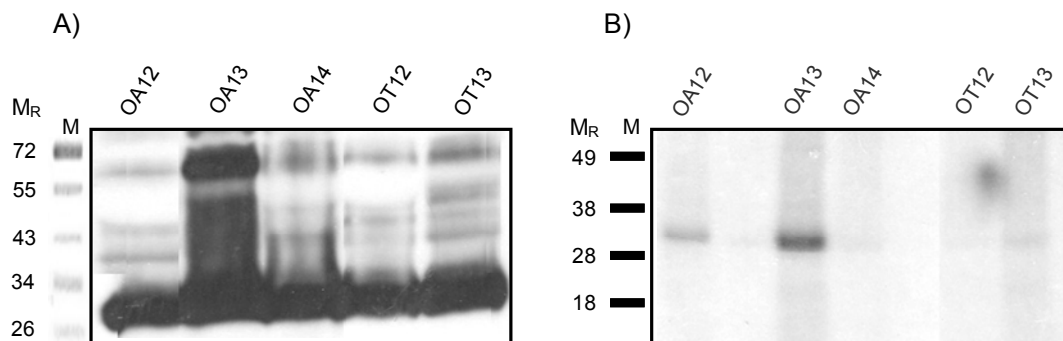
Die Akkumulation der verkürzten OspA-Varianten (OT12 und OT13) war dabei im Vergleich zu den Vollängesequenzen (OA13 und OA14) stark erhöht. Dies entspricht den Ergebnissen der Linien OA12 und OT11, die unter Verwendung des Chloroplastenexpressionsvektors pNT2 erzielt wurden: Auch hier konnte eine zehnmal höhere Akkumulation der verkürzten OspA-Variante OT11 nachgewiesen werden (Glenz et al., 2006). Im Vergleich zu den transplastomen Pflanzen der ersten Generation OA12 und OT11 konnte mit den vier neuen OspA-Konstrukten die Proteinakkumulation von rekombinantem plastidären OspA (rpOspA) in transplastomen Tabakpflanzen signifikant um das Zwei- bis Zehnfache erhöht werden. Das Ziel einer gesteigerten OspA-Akkumulation in den Chloroplasten von *N. tabacum* konnte somit durch Wahl eines geeigneten Chloroplastenexpressionsvektors erreicht werden.

#### 3.1.1.2 *In vivo*-Isotopenmarkierung

Zum Nachweis einer posttranslationalen Modifikation mit Palmitinsäure in Abhängigkeit der unterschiedlichen Signalsequenzen sollten die generierten OspA-Linien durch *in vivo*-Inkorporation mit [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure auf eine Lipidierung untersucht werden. Bei dieser Methode werden stoffwechselaktive Protoplasten isoliert und in Anwesenheit von [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure inkubiert. Wird die gegebene Signalsequenz eines Proteins als Lipidierungssignal erkannt, kommt es zum Einbau der radioaktiven Palmitinsäure in das Protein. Die inkorporierte Palmitinsäure kann im Anschluss mittels Radiographie detektiert werden. Auf diese Weise konnte bereits 1987 durch Mattoo und Edelman die Palmitoylierung des D1-Proteins von Photosystem II nachgewiesen werden (Mattoo & Edelman, 1987). Zur Untersuchung der vier neuen OspA-Varianten wurden Protoplasten der entsprechenden Pflanzenlinien isoliert und wie beschrieben (Kap. 2.6.6.3) mit [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure inkubiert. Da der verwendete Promoter *PpsbA* Licht-reguliert ist (Staub & Maliga, 1994), erfolgte die Inkubation der isolierten Protoplasten mit der radioaktiv-markierten Fettsäure unter direkter Beleuchtung. Als Positivkontrolle dienten Protoplasten der Linie OA12, für die bereits eine Inkorporation von Palmitinsäure nachgewiesen worden war (Glenz et al., 2006). Die Zellen wurden nach der Inkubation zur Lyse gefroren und nach dem Auftauen mit Lysispuffer versetzt. Dieser enthielt zur Extraktion lipophiler Bestandteile 1% Triton X-100. Da die rekombinanten Proteine an ihrem C-Terminus mit einem Poly-Histidin-Tag versehen waren, konnte durch eine anschließende Metall-Affinitätschromatographie eine Separation der Proteine von den übrigen zellulären Proteinen stattfinden. Eluierte Proteine wurden schließlich auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Detektion der

radioaktiven Palmitinsäure mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Entwicklung des Films erfolgte nach einer Inkubation von vier bis sechs Wochen bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Zum Nachweis der OspA-Akkumulation wurden Aliquots isolierter Zellen vor der Isotopenmarkierung entnommen und zur Detektion von OspA mittels Immunoblot und spezifischem Anti-OspA-Antikörper verwendet. Das Ergebnis der Immunodetektion (Abb. 3.4 A) zeigte in allen Proben der isolierten Protoplasten eine Bande entsprechend der relativen Molekülmasse von  $31 \times 10^3$ . Diese entspricht der relativen Molekülmasse von OspA und bestätigte die Proteinsynthese in den isolierten Zellen. Für den Film der Isotopenmarkierung konnte der Einbau der markierten Palmitinsäure für Probe OA12 (Positivkontrolle) und Variante OA13 anhand der Detektion einer Bande der relativen Molekülmasse von  $31 \times 10^3$  bestätigt werden (Abb. 3.4 B). Die Intensität der Bande von Probe OA13 korrelierte dabei mit der im Immunoblot nachgewiesenen starken Proteinakkumulation von OspA. Für die beiden Varianten OT12 und OT13 mit verkürzter Signalsequenz konnte keine Bande entsprechender Intensität nachgewiesen werden. Das eukaryotische Lipidierungsmotiv MGCK der Variante OT12 führte bei Expression im Zellkern von *Nicotiana benthamiana* zur Synthese einer palmytylierten Form von OspA (Hennig, 2006). Nach Expression im Chloroplasten fand, wie in Abbildung 3.4 B) zu sehen ist, keine Lipidmodifikation des Proteins mit Palmitinsäure statt. Das Motiv MGCK der N-terminalen Sequenz wurde demnach nicht als funktionelles Signal zur Lipidierung im Chloroplasten erkannt. Eine ähnliche Aussage lässt sich über das Aminosäuremotiv MACK der Variante OT13 treffen.



**Abbildung 3.4. Immunoblot und *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten transplastomer OspA-Pflanzen.** A) Immunoblot von 20  $\mu\text{l}$  isolierter Protoplasten. B) Fluorographie der *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

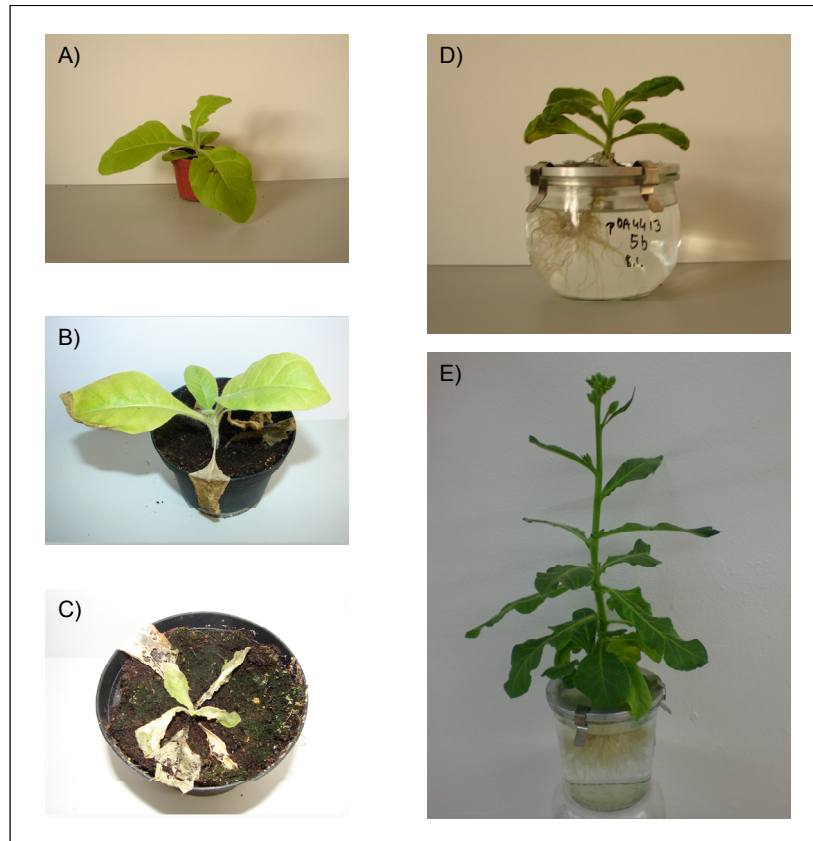
Da die Bandenintensität von OT13 im Immunoblot der isolierten Protoplasten vergleichbar mit der Intensität der Positivkontrolle OA12 war, sollte nach erfolgter Inkorporation der [9,10-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure auf dem Film der Radiographie eine Bande mit entsprechender Intensität zu erwarten sein. Es konnte jedoch keine entsprechende Bande detektiert werden. Die vorliegende Signalsequenz MACK der Variante OT13 wird daher nicht als Lipidierungsmotiv plastidärer Proteine erkannt.

Auch für die zweite Variante mit Volllängesequenz (OA14) konnte keine Inkorporation von Palmitinsäure in das Protein nachgewiesen werden. Da für OA14 im Vergleich zu OA13 die Substitution von Cystein an Position +1 mit Glycin vorlag, kann die Anwesenheit des konservierten Cysteins an Position +1 für eine Palmytylierung des Proteins im Chloroplasten als essentiell bewertet werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass unter Verwendung der neuen OspA-Varianten die gesteigerte Synthese einer lipidierten Form von OspA in Chloroplasten von *N. tabacum* erzielt werden konnte. Zudem konnte dargelegt werden, dass die Anwesenheit eines konservierten Cysteins innerhalb einer N-terminalen Signalsequenz für die Lipidierung in den Chloroplasten höherer Pflanzen in gleicher Weise wie für prokaryotische Zellen erforderlich ist.

#### 3.1.1.3 Pflanzenvitalität und endogener Zuckergehalt

Die ersten Untersuchungen zur Bestimmung der Proteinakkumulation und Proteinlipidierung der OspA-Pflanzenlinien wurden mit homoplastischen Pflanzen durchgeführt, die zunächst unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur auf MS-Medium kultiviert worden waren. Die Pflanzen waren in diesem Stadium phänotypisch nicht von Wildtyp-Pflanzen oder OA12- und OT11-Pflanzen zu unterscheiden. Die Kultivierung auf sterilem MS-Medium in Kulturgefäßen war jedoch nur bis zu einer begrenzten Größe der Pflanzen möglich, weshalb bewurzelte Pflanzen nach ca. acht bis zehn Wochen zur Erhöhung der Biomasse und zur Samenbildung auf Erde gesetzt und im Gewächshaus kultiviert wurden. Da sich die Pflanzen bereits in einem homoplastischen Zustand befanden, entfiel die Notwendigkeit des Selektionsdrucks durch Spectinomycin, ohne den Verlust des Transgens befürchten zu müssen. Auch bei der Kultivierung auf Erde zeigten OT12- und OT13-Pflanzen keinen Unterschied im Wachstum oder Erscheinungsbild im Vergleich zu OA12-Pflanzen.



**Abbildung 3.5. Vitalität transplastomer OA13-Pflanzen.** Abgebildet sind transplastome Pflanzen der Linie OA13 nach dem Umsetzen von MS-Medium auf Erde (B und C) und auf Nährlösung (D und E) im Vergleich zu einer OA12-Pflanze (A). A: OA12-Pflanze vier Wochen auf Erde; B: OA13-Pflanze drei Tage auf Erde; C: OA13-Pflanze zehn Tage auf Erde; D: OA13-Pflanze sieben Tage auf Nährlösung; E: OA13-Pflanze zehn Wochen auf Nährlösung.

Pflanzen der Linien OA13 und OA14 begannen jedoch nach zwei bis drei Tagen stark zu welken und starben nach 7-14 Tagen Kultivierung unter Gewächshausbedingungen ab (Abb. 3.5 B und C). Zur Beseitigung eines möglichen Nährstoffmangels wurden OA13- und OA14-Pflanzen nach der Bewurzelung zunächst in hydroponischer Kultur im Gewächshaus kultiviert. Allerdings begannen auch hier die Pflanzen schnell zu welken und waren nach wenigen Tagen abgestorben. Da das Wachstum der Pflanzen auf MS-Medium nicht eingeschränkt war, war es naheliegend, dass der im Medium enthaltene Zucker einen entscheidenden Faktor für die Vitalität der Linien OA13 und OA14 darstellte. Bewurzelte Pflanzen dieser Linien wurden deshalb unter sterilen Bedingungen auf eine Nährlösung

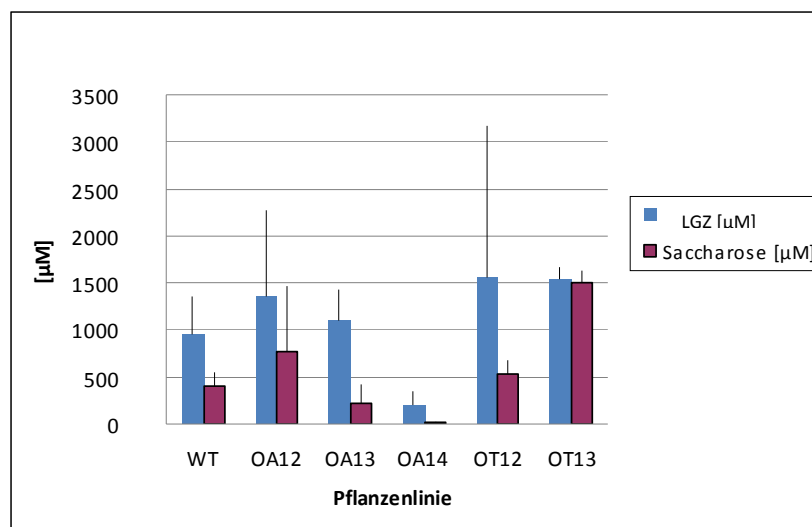
gesetzt, die Saccharose in einer Konzentration von 30 g/L enthielt. Durch Umsetzen der Pflanzen auf die zuckerhaltige Lösung konnte schließlich der Welkungsprozess inhibiert und die Kultivierung der Linien OA13 und OA14 aufrechterhalten werden (Abb. 3.5 D und E). Pflanzen, die auf Nährlösung gebracht worden waren, wurden bis zur Samenbildung in der Zellkultur kultiviert und alle sieben bis zehn Tage auf frische Nährlösung umgesetzt. Die Tatsache, dass OA13- und OA14-Pflanzen in Abwesenheit exogenen Zuckers nicht zum Wachstum befähigt waren und diesen zwingend aus dem Medium aufnehmen mussten, ließ auf eine unzureichende endogene Versorgung mit Sacchariden schließen. Um diese These zu untersuchen, wurden Blattextrakte der unterschiedlichen Pflanzenlinien erstellt und mittels PAD (Pulsed Ampерometric Detection) auf den Gehalt an löslichen Zuckern untersucht.

**Tabelle 3.2. Mittels Pulsed Amperometric Detection ermittelte Konzentrationen der löslichen Zucker für Blattextrakte der Linien WT, OA12, OA13, OA14, OT12 und OT13.** Angegeben ist die durchschnittliche Konzentration (MW [ $\mu$ M]) löslicher Gesamtzucker (LGZ), die durchschnittlichen Konzentrationen (MW [ $\mu$ M]) der Kohlenhydrate Arabinose, Glukose, Fruktose und Saccharose sowie des Zuckeralkohols Mannit von drei Pflanzen, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert worden waren. Zusätzlich angegeben ist die berechnete Standardabweichung der gemittelten Konzentrationen (SD; für OA14 konnten lediglich zwei Pflanzen untersucht werden).

durchschnittliche Konzentration löslicher Zucker [ $\mu$ M]	WT		OA12		OA13	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>totale, lösliche Zucker (LGZ)</b>	957	393	1355	920	1092	332
<b>Mannit</b>	8	4	6	4	18	15
<b>Arabinose</b>	8	4	22	7	2	1
<b>Glukose</b>	321	249	139	241	426	143
<b>Fruktose</b>	217	148	413	715	431	187
<b>Saccharose</b>	<b>403</b>	45	<b>775</b>	692	<b>216</b>	214

durchschnittliche Konzentration löslicher Zucker [ $\mu$ M]	OA14		OT12		OT13	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>totale, lösliche Zucker (LGZ)</b>	198	145	1567	1596	1541	132
<b>Mannit</b>	7	10	9	9	39	24
<b>Arabinose</b>	7	10	12	2	6	1
<b>Glukose</b>	113	57	413	715	0	0
<b>Fruktose</b>	59	63	597	1034	0	0
<b>Saccharose</b>	<b>12</b>	6	<b>536</b>	146	<b>1496</b>	128

Pflanzenlinien, die zur Untersuchung verwendet wurden, waren OA13 und OA14 sowie die Linien OT12, OT13 und OA12, die zum Wachstum nicht auf die Aufnahme von Kohlenhydraten aus dem Medium angewiesen waren. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Pflanzen von *Nicotiana tabacum*. Von jeder Linie wurden drei Pflanzen zur Zuckeranalyse verwendet. Die Versuchspflanzen wurden drei bis vier Tage nach dem Umtopfen auf Erde und Kultivierung unter Gewächshausbedingungen geerntet und zur Herstellung der Extrakte löslicher Zucker verwendet. Da vor allem OA14-Pflanzen nach dem Umsetzen auf Erde stark welkten und schnell abstarben, standen von dieser Linie lediglich zwei Pflanzen für die Analyse zur Verfügung. Die Messung des Gesamtzuckergehalts der Extrakte ergab eine durchschnittliche Konzentration von 1118  $\mu\text{M}$  (Tab. 3.2; Abb. 3.6). Dabei lagen der WT mit 957  $\mu\text{M}$  und Linie OA13 mit 1092  $\mu\text{M}$  bezüglich der Konzentration der löslichen Zucker hinter den Konzentrationen, die für Pflanzen der Linien OA12, OT12 und OT13 erzielt wurden (1355 bis 1567  $\mu\text{M}$ ). Der Gehalt löslicher Zucker der Linie OA14 lag mit einer Konzentration von lediglich 198  $\mu\text{M}$  weit unterhalb des Durchschnitts (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6. Graphische Darstellung des Gehalts löslicher Zucker.** Graphische Darstellung der mittels PAD ermittelten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der löslichen Gesamtzucker (LGZ, blauer Balken) und Saccharose (roter Balken) der Pflanzen WT, OA12, OA13, OA14, OT12 und OT13 sowie Angabe der Standardabweichung.

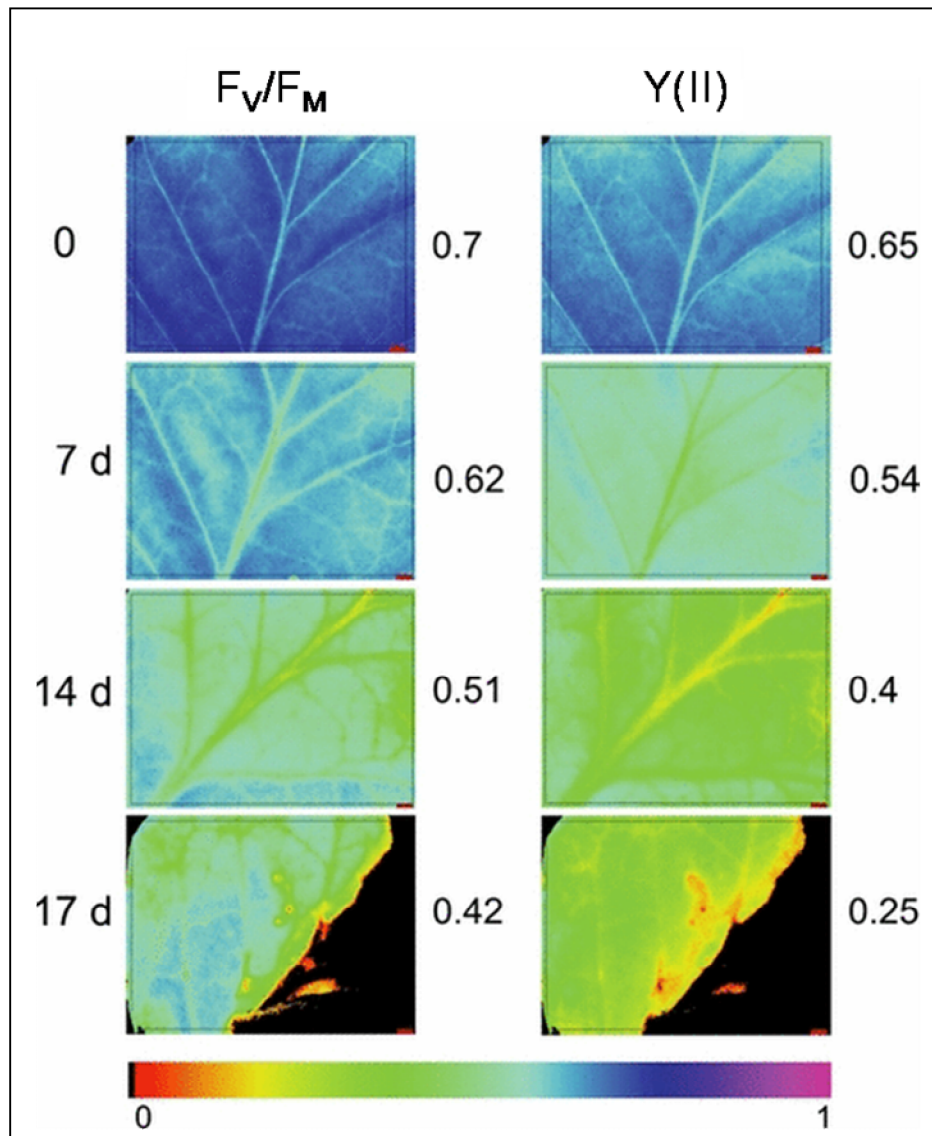
Dieser Trend spiegelt sich vor allem in der Saccharosekonzentration wider: Transplastome Pflanzen, die zu autotrophem Wachstum befähigt waren, wiesen im Vergleich zum Wildtyp einen leicht erhöhten Gehalt an Saccharose in ihren Blättern auf. Dieser war in Linien, die nicht zu autotrophem Wachstum befähigt waren (OA13 und OA14), stark erniedrigt. Die reduzierte Zuckerkonzentration schien für das Wachstum der Linien OA13 und OA14 nicht ausreichend gewesen zu sein, weshalb die beschriebenen Pflanzenlinien zur Aufnahme des Disaccharids aus dem Medium angewiesen waren. Die Messungen des endogenen Zuckergehalts der transplastomen Pflanzen stellten die Grundlage der anschließenden Chlorophyllfluoreszenz-Messungen dar (Kap. 3.1.1.4), durch die untersucht werden sollte, inwieweit die reduzierte Zuckerakkumulation in den beschriebenen Pflanzen auf eine unzureichende Photosyntheseaktivität zurückzuführen war.

#### 3.1.1.4 Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Messungen der Chlorophyllfluoreszenz basieren auf der Grundlage, dass ein Teil des absorbierten Lichtes als Lichtquanten emittiert wird. Diese Lumineszenz wird hauptsächlich von Chlorophyllmolekülen des PS II erzeugt und kann mithilfe von Fluorometern detektiert werden (Golfsev et al., 2009). Durch Bestimmung der minimalen Fluoreszenz  $F_0$  und der maximalen Fluoreszenz  $F_M$  eines dunkeladaptierten Blattes lässt sich die variable Fluoreszenz  $F_v$  berechnen. Der Quotient aus variabler Fluoreszenz und maximaler Fluoreszenz stellt die maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_M$ ) dar, die wiederum ein Maß für die Photosyntheseaktivität eines Blattes ist (Baker, 2008). Wie gezeigt werden konnte, liegt dieser Wert für nicht gestresste Blätter konstant bei 0.83, wohingegen gestresste Blätter einen Wert kleiner als 0.83 aufweisen (Björkman & Demmig, 1987). Zusätzlich erfolgte bei der Chlorophyllfluoreszenz-Messung die Bestimmung von  $F'$  und  $F'_M$  eines lichtadaptierten Blattes unter aktinischer Beleuchtung. Aus diesen Werten lässt sich die effektive Quantenausbeute PS II  $[Y(II) = (F'_M - F')/F'_M]$  berechnen, die ein Maß für die Effektivität der Reaktionszentren von PS II darstellt.

Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten an einem bildgebenden Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer (PAM-Fluorometer) wie in Kapitel 2.6.6.5 beschrieben und wurden von Frau Dr. Katharina Bonfig am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Julius-von-Sachs-Instituts in Würzburg durchgeführt. Von den Linien OA13 und OA14 wurden dafür drei unabhängige Pflanzen verwendet, von denen zwei unter Starklichtbedingungen im Gewächshaus und je

eine Pflanze unter Schwachlichtbedingungen im Labor kultiviert wurden. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz begann an Tag 0 nach dem Transfer der Pflanze von MS-Medium auf Erde und erfolgte täglich über einen Zeitraum von ca. vier Wochen zur Ermittlung der Parameter  $F_V/F_M$  und  $Y(II)$ .



**Abbildung 3.7 Chlorophyllfluoreszenz-Imaging mittels PAM-Fluorometrie.** Abgebildet sind die Ergebnisse der Chlorophyllfluorometrie eines Blattes einer OA13-Pflanze. Diese stehen stellvertretend für die Ergebnisse aller untersuchten OA13- und OA14-Pflanzen. Die Parameter  $F_V/F_M$  und  $Y(II)$  wurden täglich nach dem Umsetzen der Pflanze auf Erde für drei definierte Bereiche zwischen den Blattadern ermittelt (siehe Anhang). Die aus den drei Bereichen berechneten Mittelwerte für  $F_V/F_M$  und  $Y(II)$  sind jeweils rechts neben der entsprechenden Messung angegeben. Der linken Spalte ist der Zeitpunkt der Messung in Tagen (d) nach dem Umsetzen auf Erde zu entnehmen. Die Bildgebung erfolgte mithilfe eines Falschfarbensystems mit einer Skala von 0.000 (schwarz) bis 1.000 (violett).



Aufgrund des voranschreitenden Verkümmerns der Pflanzen war der Zeitraum der Messungen auf maximal 31 Tage beschränkt. Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Messungen einer OA13-Pflanze. Diese stehen stellvertretend für die Messungen der übrigen untersuchten Pflanzen.

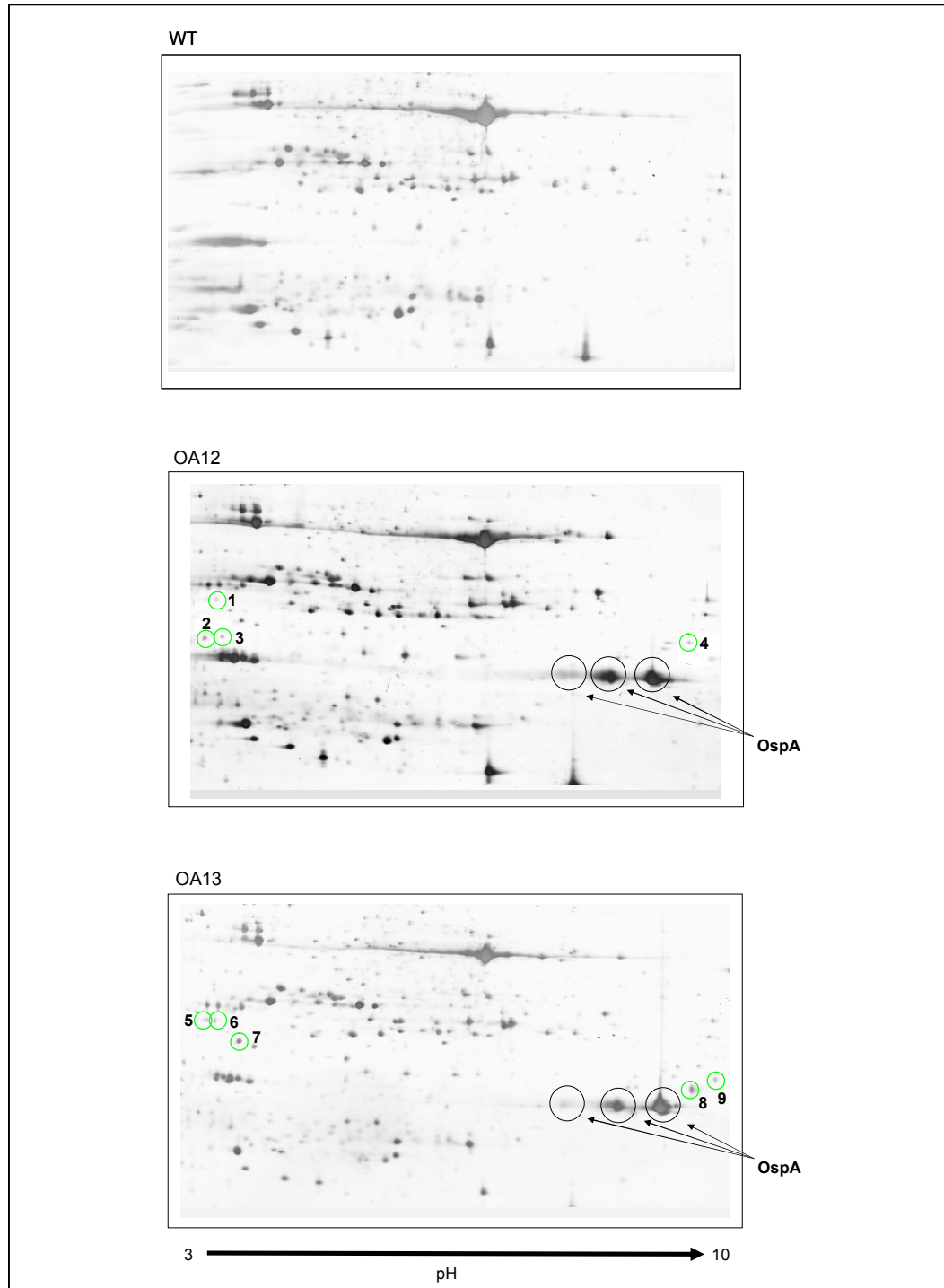
Wie sich herausstellte, wiesen die untersuchten Pflanzen bereits an Tag 0 der Messungen einen reduzierten  $F_V/F_M$ -Wert von 0.7 auf, der auf eine eingeschränkte Photosyntheseaktivität schließen lässt. Innerhalb der nächsten 31 Tage nach dem Transfer der Pflanze auf Erde sank  $F_V/F_M$  schließlich auf einen Wert von 0.28. Die relative Quantenausbeute (YII) nahm im gleichen Zeitraum ab und sank von 0.65 auf einen Wert von 0 ab. Wie sich aus Abbildung 3.7. erkennen lässt, konnten die Defekte in PS II zunächst in der Nähe der Blattadern detektiert werden. Von dort breitete sich der Defekt in PS II über die gesamte Blattspreite aus. Diese Feststellung lässt darauf schließen, dass es sich bei der Störung in PS II um einen allgemeinen Effekt handelte und nicht um einen lokal begrenzten Defekt des Photosyntheseapparates. Die genannten Beobachtungen und die gemessenen Defizite in der Photosyntheseleistung des PS II konnten allgemein für alle mittels PAM-Fluorometrie untersuchten Pflanzen der Linien OA13 und OA14 gemacht werden. Der einzige Unterschied zwischen den untersuchten Pflanzen lag in der Progression der Degradation von PS II. Diese verlief bei Pflanzen, die unter Starklichtbedingungen kultiviert wurden, rascher als bei Pflanzen, die unter Schwachlichtbedingungen wuchsen.

Mit diesen Ergebnissen konnte belegt werden, dass die reduzierte Vitalität von OA13- und OA14-Pflanzen aufgrund eines endogenen Mangels an Saccharose auf Defekte des PS II zurückzuführen war.

#### 3.1.1.5 2D-Gel-Analyse

Während sich OA12-Pflanzen kaum von Wildtyp-Pflanzen von *Nicotiana tabacum* unterschieden, zeichneten sich Pflanzen der Linie OA13 und OA14 durch ein eingeschränktes Wachstum aus und waren aufgrund einer limitierten Photosyntheseaktivität auf die Aufnahme von exogenem Zucker aus dem Medium angewiesen. Um herauszufinden, ob die Reduktion der Photosyntheseaktivität auf eine Depletion von Proteinen zurückzuführen war, wurde das Proteom von OA12- und OA13-Pflanzen mittels 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) analysiert.

Für die 2D-PAGE wurden ca. zehn Wochen alte Pflanzen der Linien OA12 und OA13 verwendet. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in der Zellkultur auf MS-Medium.



**Abbildung 3.8. 2D-Gel-Analyse.** Abgebildet sind die 2D-Gele des Proteoms von Blättern der Pflanzenlinien WT, OA12 und OA13. In schwarzen Kreisen angegeben sind Spots, die mittels LC-MS/MS-Analyse als OspA identifiziert wurden. Mit grünen Kreisen markiert sind differentielle Spots (siehe Tabelle 3.3). Der pH-Gradient verlief von pH 3 (links) bis pH 10 (rechts).

Als Kontrolle dienten Wildtyp-Pflanzen von *Nicotiana tabacum*, die unter gleichen Bedingungen kultiviert worden waren.

Nach der Methode von Wang *et al.* (2006) wurde zunächst wie unter Kapitel 2.6.3.6 beschrieben das Gesamtprotein der Pflanzen isoliert. Vom gereinigten Proteom wurden 200 µg in 100 µl Rehydratisierungspuffer resolubilisiert und für die Versuche verwendet. Für jede Probe wurden zwei Gele angefertigt und ausgewertet. Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und die anschließende Färbung mittels Silbernitrat erfolgten wie in den Kapiteln 2.6.3.8. und 2.6.3.3 beschrieben. Spots wurden als differentiell bewertet, wenn sie sich mindestens um das 3-fache in ihrer Intensität unterschieden. Differentielle Spots wurden im Anschluss aus den Gelen isoliert und einer LC-MS/MS-Analyse unterzogen. Ein Vergleich der gefärbten Gele zeigte für Konstrukte OA12 und OA13 im Unterschied zum WT-Gel drei mächtige differentielle Spots, die in der anschließenden LC-MS/MS-Analyse als OspA identifiziert wurden (Abb. 3.8). Im Vergleich zum WT zeigten die Gele der transplastomen Pflanzen eine geringere Intensität der übrigen Proteine. Diese war jedoch nicht stark genug ausgeprägt, um die entsprechenden Spots als differentiell zu bewerten. Da eine konstante Menge Gesamtprotein für die elektrophoretische Auftrennung verwendet worden war, OspA in den transplastomen Linien einen Anteil von 1%-10% des LGP einnimmt, war die Minderung der Proteinintensität endogener Proteine auf die Anwesenheit hoher Mengen OspAs zurückzuführen. Obwohl OA13-Pflanzen eine 10-fach gesteigerte Akkumulation des rekombinanten Proteins aufwiesen als OA12-Pflanzen, konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Größe oder der Intensität der entsprechenden Spots detektiert werden. Für beide transplastome Linien OA12 und OA13 konnte im Vergleich zum WT ein Plasmamembranprotein (DREPP2) als differentiell detektiert werden. Zusätzlich wiesen OA12-Pflanzen im Vergleich zum Proteom der OA13-Pflanzen zwei differentielle Proteine auf (Tab. 3.3): Das Plastiden-lipidassoziierte Protein (PAP) stellt die Hauptkomponente von in Plastiden lokalisierten Plastoglobuli dar. Diese Kompartimente dienen als Lipidspeicher und weisen einen großen Anteil von PAP auf ihren äußeren Oberflächenmembranen auf (Pozueta-Romero *et al.*, 1997). Ein weiteres für OA12 als differentiell detektiertes Protein ist die Malatdehydrogenase. Dieses Enzym ist sowohl in den Mitochondrien als auch den Plastiden lokalisiert. In den Mitochondrien spielt es eine wichtige Rolle im Krebszyklus, während es in den Plastiden am Ausgleich der Redoxequivalente zwischen Cytosol und Stroma beteiligt ist. Zudem konnte ein Einfluss der Aktivität der Malatdehydrogenase auf die Akkumulation von Kohlenhydraten und auf Elektronentransport- sowie Photosyntheserate nachgewiesen werden (Nunes-Nesi *et al.*, 2005). Für die Variante OA13 konnten im

Vergleich zum WT oder der autotrophen Form OA12 drei differentielle Spots detektiert werden (Tab. 3.3). Diese konnten als Cysteinsynthase 1, Glucan-Endoglucosidase und Chloroplasten-ribosomales Protein identifiziert werden. Die Cysteinsynthase ist ein hetero-oligomerer Komplex, der sich aus Serin-Acetyltransferase und O-Acetylserin-Thiollyase zusammensetzt. Das Enzym ist in den Plastiden, vor allem in den Chloroplasten lokalisiert und ist essentiell für die Cysteinsynthase (Wirtz & Hell, 2007). Die Glucan-Endoglucosidase ist ein Enzym mit einer molaren Masse von 33 kg/Mol, dessen Regulation von Entwicklungsprozessen der Pflanze abhängt. Zudem weiß man, dass die Expression des Enzyms als Antwort auf einen Pathogenbefall induziert wird (Shinshi et al., 1988). Als weiteres differentielles Protein der Linie OA13 wurde außerdem ein plastidäres ribosomales Protein identifiziert. Von der Familie der plastidären ribosomalen Proteine sind 21 verschiedene Proteine bekannt. Diese sind vor allem an Translationsprozessen beteiligt (Rogalski et al., 2006).

**Tabelle 3.3. Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse differentieller Spots der 2D-Gel-Analyse.** Angegeben sind Spotnummer und Gen-Identifikationsnummer (GI-Nummer) identifizierter Proteine sowie die jeweilige Pflanzenlinie.

Spot	Identifiziertes Protein	GI- Nummer	Pflanzenlinie
1, 6	Nicht identifiziert		OA12, OA13
2	Plastiden-lipidassoziiertes Protein (PAP)	2632088	OA12
3, 7	Plasmamembranprotein (DREPP2)	7801129	OA12, OA13
4	Malatdehydrogenase	52139820	OA12
5	Cysteinsynthase 1	76556492	OA13
8	Glucan-Endoglucosidase	226121	OA13
9	Chloroplasten-ribosomales Protein	577089	OA13

Mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender LC-MS/MS-Analyse konnten Proteine als differentiell identifiziert werden, die Funktionen im Metabolismus der Pflanze haben und entwicklungsabhängig reguliert werden (Malatdehydrogenase, Cystein-Synthase und Glucan-Endoglucosidase) sowie Proteine, die in Zusammenhang mit der Translation oder hydrophoben Kompartimenten innerhalb der Chloroplasten stehen (Plastiden-lipidassoziiertes Protein, plastidäres ribosomales Protein und DREPP2).

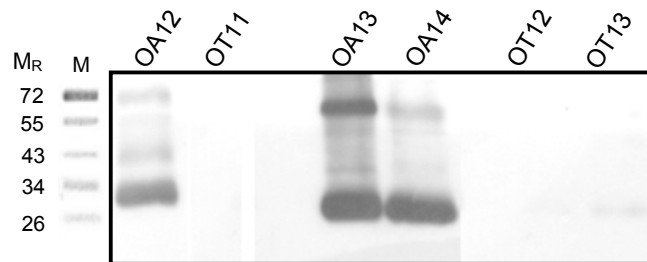
Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Tatsache, dass es sich bei den Pflanzen OA12 und OA13 um transplastome Pflanzen mit einer gesteigerten Produktion eines Lipoproteins innerhalb der Chloroplasten handelte. Es konnten allerdings keine differentiellen Proteine detektiert werden, die eine Störung des Photosyntheseapparates von OA13-Pflanzen auf eine Depletion von Proteinen zurückführten. Man kann deshalb davon ausgehen, dass es sich bei OA13-Pflanzen um einen lokalen Effekt der sterischen Inhibierung des Photosystems handelte, der durch die Anwesenheit des rekombinanten Proteins verursacht wurde.

#### 3.1.1.6 Thylakoidisolierung

Für die Synthese von rekombinantem OspA in Chloroplasten von *N. tabacum* konnte bereits gezeigt werden, dass die Lokalisation des Proteins der Variante OA12 an den Membranen des Thylakoidsystems erfolgte, während die nicht lipidierter Variante OT11 im Stroma akkumulierte und nicht an den Thylakoiden nachgewiesen werden konnte (Hennig, 2006). Für die neuen Varianten OA13, OA14, OT12 und OT13 sollte ebenfalls die Lokalisation des Proteins innerhalb der Chloroplasten bestimmt werden.

Die Membranisolierung erfolgte nach der Methode von Machold und Meister (1979) wie in Kapitel 2.6.6.1 beschrieben. Isolierte Membranen wurden in Lagerungspuffer bei -20°C aufbewahrt und direkt vor dem Gebrauch resuspendiert. Aliquots von 20 µl dienten zum Nachweis von OspA mittels SDS-PAGE und Immunoblot. Wie gezeigt werden konnte (Abb. 3.9), lag OspA der beiden Volllänge-Varianten OA13 und OA14 in Assoziation zu den Thylakoidmembranen vor, während die beiden verkürzten Varianten OT12 und OT13 nicht an den Membranen des Thylakoidsystems nachgewiesen werden konnten. Dies entsprach dem Ergebnis für die OspA-Variante OT11, die ohne Lipidmodifikation im Chloroplasten synthetisiert wurde und im löslichen Stroma akkumulierte. Da für OA14 im Gegensatz zu OA13 keine Inkorporation von Palmitinsäure im Versuch der *in vivo*-Isotopenmarkierung nachgewiesen werden konnte, das Protein aber an den Membranen des Thylakoidsystems

detektiert wurde, bedeutet dies, dass die Assoziation von OspA in erster Linie auf die Anwesenheit einer Volllängesignalsequenz des Proteins zurückzuführen ist und weniger auf eine resultierende Lipidmodifikation.



**Abbildung 3.9. Immunoblot isolierter Thylakoidmembranen.** Aufgetragen wurden 20  $\mu$ l isolierter Membranen der transplastomen Pflanzen OT11, OA12, OT12, OT13, OA13 und OA14. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

### 3.1.2 Verwendung alternativer Signalsequenzen als Lipidierungsmotiv

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine gesteigerte Akkumulation von rpOspA in Abhängigkeit der Präsenz einer bakteriellen Volllängesignalsequenz zu einer Diskrepanz zwischen Proteinakkumulation und Photosynthese. Inwieweit dieser Umstand auf den bakteriellen Ursprung der verwendeten Signalsequenz zurückzuführen ist, ist unklar. Zur weiteren Untersuchung dieses Problems, sollten neue OspA-Konstrukte generiert werden, die für ein OspA mit endogenen Signalsequenzen kodierten.

Sequenzen, die zu diesem Zweck auf ihr Lipidierungspotential getestet werden sollten, waren plastidäre endogene, putative Signalmotive. Während Palmitoylierungen und Lipidierungen von Proteinen in eukaryotischen Zellen weit verbreitet sind (Smotrys & Linder, 2004), ist über die Mechanismen der Lipidierung in Chloroplasten pflanzlicher Zellen wenig bekannt. Eine Palmitoylierung konnte bisher für das D1-Protein (Protein des plastidären *psbA*-Gens) von Photosystem II nachgewiesen werden (Mattoo & Edelman, 1986). Die Mechanismen der Lipidierung sind dabei unklar. Pflanzliche Signalsequenzen, deren Lipidierungspotential untersucht werden sollte, waren putative Lipidierungssequenzen der plastidären Proteine D1 (*psbA*), CP47 (*psbB*) und CP43 (*psbC*) aus *Nicotiana tabacum*. Die Auswahl der Sequenzen genannter Proteine wurde aufgrund von Homologien zur bakteriellen Lipobox getroffen (Tab. 3.4).

**Tabelle 3.4. Putative endogene Signalsequenzen.** Aufgelistet sind plastidäre Proteine von *N. tabacum* und ihre entsprechenden putativen Lipidierungsmotive, die zur Klonierung an OspA verwendet wurden, im Vergleich zur N-terminalen Signalsequenz von OspA. Cysteine innerhalb der putativen Lipobox sind fett hervorgehoben.

Konstrukt	Protein	Organismus	N-terminale Signalsequenz
OA12	OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	MEKYLLGIGLILALIACK...
Lip11	D1 ( <i>psbA</i> )	<i>Nicotiana tabacum</i>	MVLHFLLG <b>V</b> ACY...
Lip12	CP47 ( <i>psbB</i> )	<i>Nicotiana tabacum</i>	MGIHLFLSG <b>V</b> AC <b>F</b> GRS...
Lip13	CP43 ( <i>psbC</i> )	<i>Nicotiana tabacum</i>	MVSVFGFIAC <b>C</b> F <b>V</b> RS...

Wie das D1-Protein stellen CP43 und CP47 als Komponenten des Antennenkomplexes von PS II membranständige Proteine der photochemisch aktiven Thylakoidmembranen dar, die maßgeblich am Elektronentransport innerhalb der Photosysteme beteiligt sind (Lucinski & Jackowski, 2006). Zur Untersuchung des Lipidierungspotentials der ausgewählten Sequenzmotive und ihres Einflusses auf die Vitalität der Pflanzen nach Akkumulation in den Plastiden, sollten die N-terminalen Sequenzen entsprechender Proteine durch Fusion an eine Variante von OspA ohne Signalsequenz als sogenannte Lipobox-Konstrukte stabil in das Chloroplastengenom von *Nicotiana tabacum* integriert werden.

#### 3.1.2.1 Klonierung der Lipobox-Konstrukte

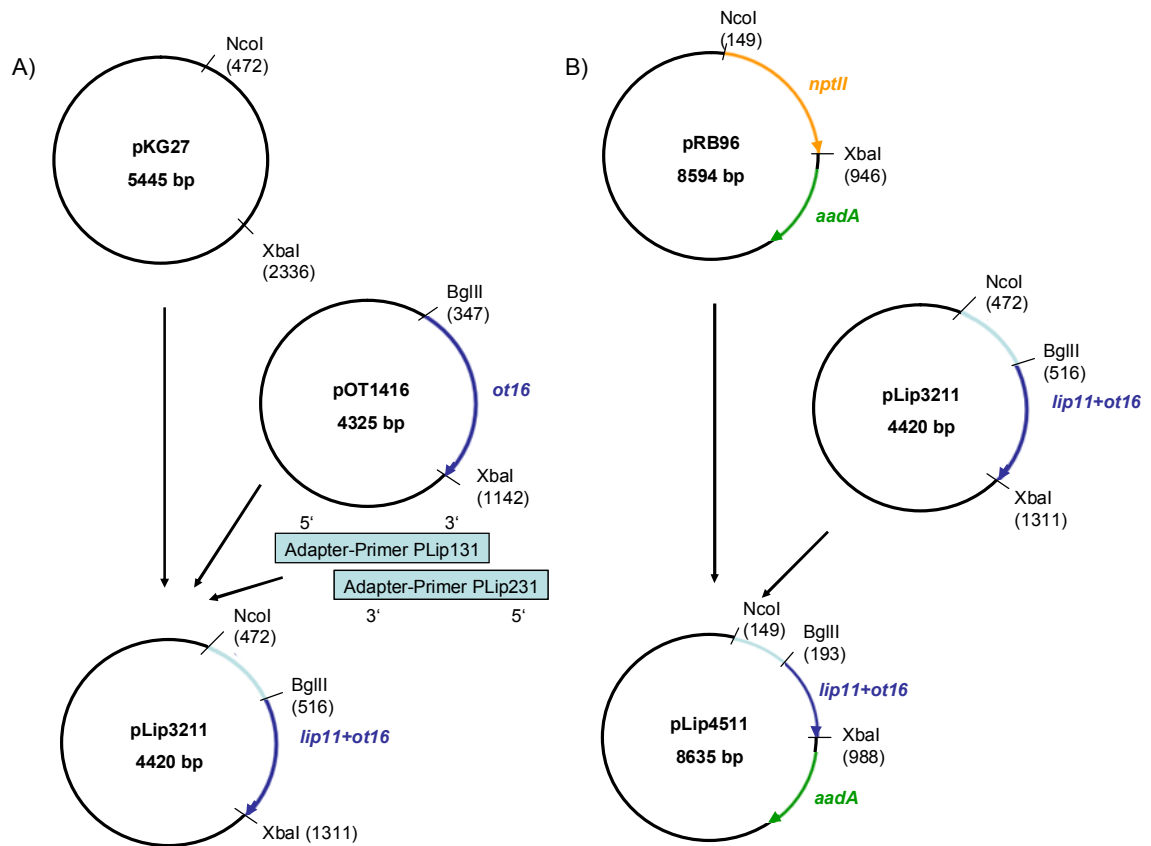
Da allein das Potential der putativen Lipoboxen zur Palmitoylierung innerhalb der Chloroplasten untersucht werden sollte, musste zur Klonierung der Lipobox-Konstrukte zunächst eine *ospa*-Variante generiert werden, die für das Kernprotein ohne N-terminale Signalsequenz kodierte (OT16). Die Amplifikation von *ot16* erfolgte mittels PCR und dem Vektor pOT4413 als Matrize wie unter Kap. 2.6.2.6 beschrieben. Als Primer wurden die Nukleotidsequenzen POT112 und POAhis rev (Tab. 2.1) verwendet. Primer POT112 diente zur Modifikation von *ospa*, indem anstelle der Signalsequenz eine *NcoI/BglII*-Schnittstelle eingefügt wurde. Durch den Reverse-Primer POAhis rev wurde *ospa* am C- Terminus mit einer für einen 6×Histidin-Tag kodierenden Sequenz und einer *XbaI*-Schnittstelle versehen. Aus der Ligation des Amplifikats mit Vektor pCR-blunt resultierte Plasmid pOT1416, das zur Überprüfung der korrekten Basenfolge sequenziert wurde. Das Insert wurde anschließend als *BglII/XbaI*-Fragment aus dem Klonierungsvektor isoliert (Abb. 3.10). Da die ausgewählten putativen Lipoboxen kurze Nukleotidsequenzen darstellten, konnte die anschließende Ligation an *ot16* über Adapter-Primer stattfinden. Die Adapter-Primer waren zu diesem Zweck derart konzipiert, dass nach Annealing komplementärer Sequenzen eine *NcoI*-Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine *BglII*-Schnittstelle am 3'-Ende entstanden. Zur Ligation wurde 1 µl des mit *NcoI* und *XbaI* geöffneten Vektors pKG27 mit jeweils 1 µl Primer forward und 1 µl Primer reverse der jeweiligen Adapter-Primer (Tab. 3.5) und 5 µl gereinigtes *ot16*-Fragment (*BglII*- und *XbaI*-geschnitten) verwendet und das Ligationsprodukt zur anschließenden Transformation von *E. coli*-Zellen herangezogen. Die daraus entstandenen Plasmide pLip3211, pLip3212 und pLip3213 wurden isoliert und einer erneuten Sequenzierung unterzogen.



**Tabelle 3.5. Adapter-Primer putativer Lipoboxen.** Aufgeführt sind die zur Klonierung in Vektor pKG27 mit Fragment *ot16* verwendeten Adapter-Primer der putativen Lipoboxen endogener plastidärer Proteine sowie das aus der Ligation resultierende Plasmid.

Putative Lipobox	Primer for	Primer rev	Resultierendes Plasmid
D1	PLip131	PLip231	pLip3211
CP47	PLip132	PLip232	pLip3212
CP43	PLip133	PLip233	pLip3213

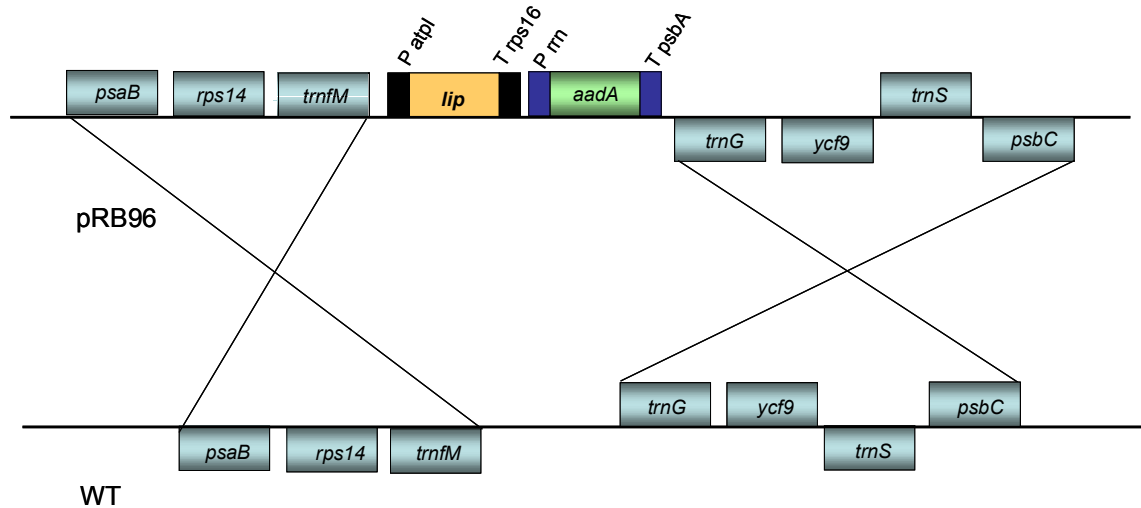
Plasmide mit korrekter Basenfolge wurden im Anschluss einem Verdau mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* unterzogen und die isolierten Fragmente der Größe 800 bp zur Ligation in den mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* geöffneten Vektor pRB96 verwendet (Abb. 3.10). Anders als für Vektor pRB95, der zu Klonierung der *OspA*-Konstrukte verwendet worden war, erfolgte die Kontrolle der Expressionskassette in Vektor pRB96 durch den Promoter des Gens der  $H^+$ -ATPase Untereinheit IV *PatpI*. Dadurch sollte eine mangelnde Vitalität generierter transplastomer Linien aufgrund einer Überexpression des Transgens unter der Kontrolle des starken Promoters *PpsbA* in Verbindung mit einer möglichen Lokalisation des Genprodukts an den Thylakoidmembranen vermieden werden. Nach der Transformation von *E. coli* mit dem Ligationsprodukt pLip4511, pLip4512 beziehungsweise pLip4513 wurden transgene Kolonien mittels PCR-Colony-Screen identifiziert und nach Kultivierung in LB-Medium einer Plasmid-Präparation unterzogen. Nach einem Kontrollverdau mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* erfolgte die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.



**Abbildung 3.10. Schema zur Klonierung der Lipobox-Konstrukte anhand Lipobox-Konstrukt Lip11.** A) Die Ligation mit dem Vektor pKG27, dem *ot16*-Fragment (dargestellt in Dunkelblau) und den Adapter-Primern resultierte in Vektor pLip3211. B) Das Fragment aus *lip11* (dargestellt in Hellblau) und *ot16* wurde mittels *NcoI* / *XbaI*-Verdau aus dem Vektor pLip3211 isoliert und in den mit den selben Enzymen linearisierten Chloroplastentransformationsvektor pRB96 ligiert (Kanamycin-Resistenzgen *nptII* in Orange, Spectinomycin-Resistenzgen *aadA* grün dargestellt). Aus der Ligation resultierte Vektor pLip4511. Analog dazu fand die Klonierung der Lipobox-Konstrukte pLip4512 und pLip4513 statt.

### 3.1.2.2 Stabile Chloroplastentransformation

Die Präparation der Goldpartikel sowie die Transformation der Blätter von *N. tabacum* erfolgten wie in Kapitel 2.6.4.1 beschrieben, wobei pro Konstrukt zehn Blätter beschossen wurden. Aufgrund der die Expressionskassette flankierenden homologen Bereiche *trnFM* und *trnG* des Vektors pRB96 erfolgte die Integration der Expressionskassette zielgerichtet in das Chloroplastengenom mittels doppelter homologer Rekombination (Abb. 3.11). Zur Selektion



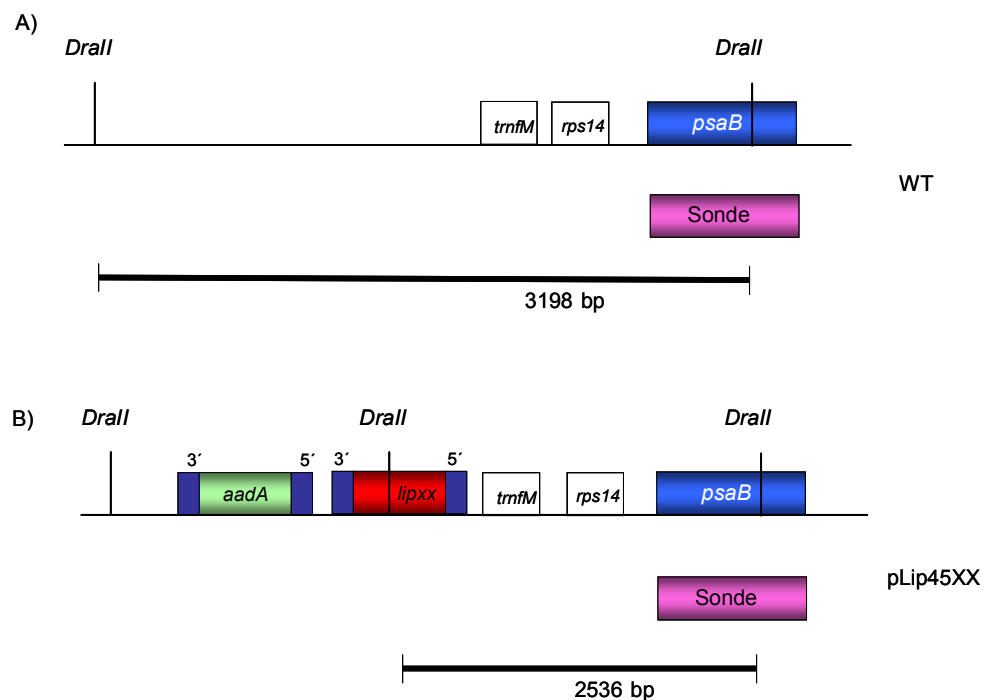
**Abbildung 3.11. Schematische Darstellung zur Chloroplastentransformation mit Vektor pRB96.** Direkt strangaufwärts des *aadA*-Gens (grün unterlegt) befindet sich das Transgen (orange unterlegt) unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente 5'-*atpl* und 3'-*rps16*. Die homologe Rekombination der Expressionskassette mit dem WT-Genom erfolgt über die flankierenden Bereiche *psaB-rps14-trnFM* und *trnG-ycf9-trnS-psbC*. Die Transkription erfolgt für Gene über der angegebenen Linie von links nach rechts und für Gene unter der Linie von rechts nach links.

wurden die beschossenen Blätter auf Spectinomycin-haltigem RMOP-Medium kultiviert und entstehende Kalli vereinzelt auf Selektionsmedium gesetzt. Isolierte DNA dieser Pflanzen wurde mittels PCR mit den entsprechenden, für das Transgen kodierenden Primerpaaren identifiziert. Damit konnten Pflanzen, die aufgrund einer Spontanmutation resistent gegen das Antibiotikum waren, ausgeschlossen werden.

#### 3.1.2.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen

Da nach dem Beschuss mittels Genegun nur wenige Chloroplastengenome transformiert werden, befinden sich erste Pflänzchen in einem sogenannten heteroplastischen Zustand, in dem neben WT-Genom auch transgene Chloroplastengenome in der Pflanzenzelle existieren. Um einen stabilen homoplastischen Zustand zu erreichen, wurden entstehende Blätter vom Muttergewebe entfernt und erneut auf Selektionsmedium ausgebracht. Nach

weiteren zwei bis drei Zyklen Regeneration waren alle WT-Chloroplastengenome verdrängt worden und transgene homoplastische Pflanzen entstanden. Zur Überprüfung des homoplastischen Zustands wurden die generierten Pflanzen einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) unterzogen (Kap. 2.6.5.5). Dafür wurde Gesamt-DNA der Pflanzen isoliert und 2 µg DNA einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *DraII* unterzogen. Dieses Enzym schneidet die isolierte DNA vielfältig, wobei für plastidäre DNA ein 3198 bp großes Fragment entsteht, auf welchem das *psaB*-Gen liegt. Dieses Fragment kann durch Hybridisierung mit einer dem *psaB*-Gen komplementären Sonde detektiert werden. Da durch die Integration des Transgens eine zusätzliche *DraII*-Schnittstelle im Plastidengenom entsteht, resultiert aus einem Restriktionsverdau ein nur etwa 2536 bp großes Fragment, das mit der Sonde hybridisiert (Abb. 3.12).

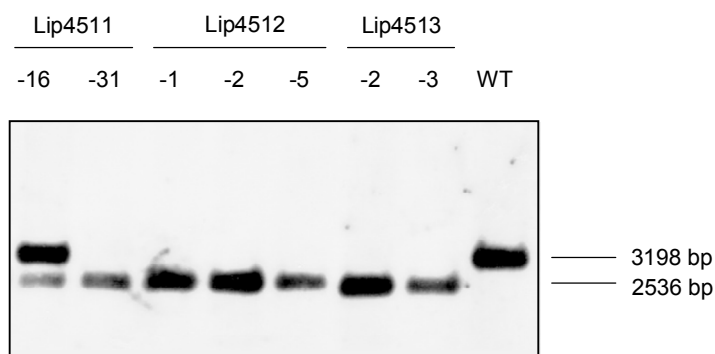


**Abbildung 3.12. Schema der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) der Lipobox-Konstrukte.** A) Nach einem Verdau von WT-DNA mit *DraII* liegt das *psaB*-Gen (blau unterlegt) auf einem 3198 bp großen Restriktionsfragment. Die Detektion von *psaB* erfolgte mittels einer DIG-dUTP markierten Sonde (lila unterlegt). B) Durch die zusätzliche *DraII*-Schnittstelle innerhalb des Transgens (rot unterlegt) erfolgte die Hybridisierung der Sonde nach einem Verdau isolierter DNA mit einem nur 2536 bp großen Restriktionsfragment.

Pflanzen, die sich in einem heteroplastischen Zustand befanden, wiesen sowohl die 2536 bp-Bande des Transgens als auch die 3198 bp große Bande der WT-DNA im Blot auf (Abb. 3.13). Da die Signalstärke mit der Menge an detektierter DNA korreliert, konnte im Laufe der Selektion eine Abnahme der Intensität der WT-Bande beobachtet werden.

Die Synthese der zur Hybridisierung verwendeten Sonde erfolgte wie in Kapitel 2.6.5.4 beschrieben mit Vektor pRB95 als Matrize und dem Primerpaar PpRB95 for und PpRB95 rev. Nach dem Verdau der DNA mit *Dra*II wurden die erhaltenen Restriktionsfragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung mit der DIG-dUTP markierten Sonde. Pflanzen, die mittels RFLP-Analyse als homoplastisch identifiziert worden waren, wurden zur Bewurzelung auf MS-Medium gesetzt und anschließend in Weck-Gläsern in der Zellkultur oder auf Erde im Gewächshaus kultiviert.

Da durch die gezielte Integration der Expressionskassette mittels homologer Rekombination alle mit einem Konstrukt transformierten Pflanzen genetisch und phänotypisch identisch sind, war es nicht nötig, zwischen einzelnen generierten Pflanzen eines Konstrukts zu unterscheiden. Die generierten Lipobox-Pflanzen zeigten weder bei der Kultivierung unter sterilen Bedingungen noch im Gewächshaus phänotypische Abweichungen vom Erscheinungsbild der WT-Pflanzen, so dass eine Inhibierung des PS II ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 3.13. Ergebnis der RFLP-Analyse transgener Lipobox-Pflanzen.** Abgebildet ist das Ergebnis des DNA-Blots von zwei Linien des Konstrukts Lip4511 (Linie 16 und 31), drei Linien des Konstrukts Lip4512 (Linie 1, 2 und 5), und zwei Linien des Konstrukts Lip4513 (Linie 2 und 3). Als Negativkontrolle diente WT-DNA. Die für das WT-Genom charakteristische Bande der Größe 3198 bp konnte für WT und Lip4511-16 detektiert werden. Für alle weiteren getesteten Linien konnte nur eine dem Transgen entsprechende Bande der Größe 2536 bp detektiert werden. Diese Pflanzen befanden sich daher in einem homoplastischen Zustand.

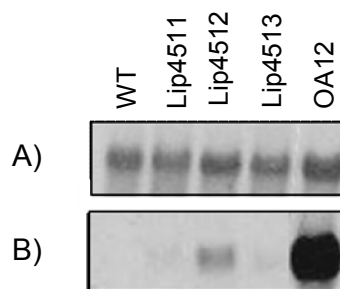
### 3.1.2.4 Proteinakkumulation und Transgenexpression

Erste Untersuchungen zur Proteinsynthese der generierten Lipobox-Pflanzen erfolgten an zur Bewurzelung auf MS-Medium wachsenden Individuen. Von diesen wurde 100 mg Blattmaterial geerntet und ein Gesamtproteinextrakt (Kap. 2.6.3.2) erstellt. Dieser wurde elektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des Kernproteins OT16 erfolgte mit einem monoklonalen anti-OspA-Antikörper. Als Positivkontrolle dienten 1 µg gereinigtes, rekombinant in *E. coli* synthetisiertes OspA. In allen drei Linien der Lip-Konstrukte konnte OspA im Immunoblot detektiert werden (Abb. 3.14). Im Vergleich zu den OspA-Konstrukten OA12, OA13, OA14, OT12 oder OT13 war die Intensität der Banden, die positiv mit der Menge an detektiertem Protein korreliert, gering. Mit fortschreitendem Alter transgener Pflanzen nahm die Menge an rekombinantem Protein, die mittels Immunoblot detektiert werden konnte, weiter ab. Inwieweit die geringe Proteinakkumulationsrate der Lipobox-Konstrukte auf eine unzureichende Transkription des Transgens zurückzuführen war, sollte mittels RNA-Blot geklärt werden. Dazu wurde von ca. zehn Wochen alten Pflanzen der Linien Lip4511, Lip4512 und Lip4513, die im Gewächshaus kultiviert worden waren, Gesamt-RNA isoliert. Als Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle diente isolierte RNA von OA12-beziehungsweise WT-Pflanzen.



**Abbildung 3.14. Immunoblot von Pflanzen der Lipobox-Konstrukte.** Aufgetragen wurde Gesamtproteinextrakt von drei Pflanzen der Linien Lip4511 und Lip4512 sowie einer Lip4513-Pflanze. Als Positivkontrolle diente 1 µg gereinigtes rbOspA aus *E. coli*. Die Detektion von OspA erfolgte mittels anti-OspA-Antikörper. M: Proteinmarker; Mr: Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

Die isolierte RNA wurde zunächst unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran konnte die Gesamt-RNA mit Methylenblau reversibel gefärbt werden. Dieser Schritt diente zur Kontrolle der aufgetragenen RNA und bestätigte eine vergleichbare Menge transferierter RNA der verschiedenen Proben anhand der Bande der 23S-rRNA (Abb. 3.15 A). Anschließend folgte die Detektion des spezifischen Transkripts mittels einer dem *ospa*-Gen komplementären Sonde (Glenz, 2005). Im Vergleich zur Positivkontrolle OA12, die sich durch eine mäßige Proteinakkumulation von 1% des LGP auszeichnete, konnte für die Lipobox-Konstrukte im RNA-Blot nur eine sehr geringe Transkription für Variante Lip4512 beziehungsweise keine Transkription des Transgens für Lip4511 und Lip4513 nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B). Die mangelnde Proteinakkumulation der generierten Lipobox-Pflanzen war demnach Resultat einer geringen Transkriptionsrate der Genkassette aufgrund einer schwachen Promoteraktivität des alternativen Expressionsvektors pRB96. Im Unterschied zum bisher verwendeten Vektor pRB95 steht das Transgen hier unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente 5'-*atpI* und 3'-*rps16*, die im Falle der Lipobox-Konstrukte zu einer unzureichenden Transkriptionsrate des Transgens führten. Aufgrund der geringen Expressionsrate, die mit pRB96 erzielt wurde, war es nicht möglich, eine ausreichende Menge an Protein zur Quantifizierung oder Bestimmung der Lokalisation des Proteins innerhalb der Plastiden zu erhalten. Ebenso konnte eine erfolgreiche *in vivo*-Isotopenmarkierung zur Untersuchung des Lipidierungsstatus des rekombinanten Proteins nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 3.15. RNA-Blot transplastomer Lipobox-Pflanzen.** A) Methylenblau-Färbung isolierter 23S-rRNA. B) Detektion des spezifischen Transkripts nach Hybridisierung der RNA mit der *ospa*-Sonde.

#### 3.1.3 Ermittlung eines minimalen Lipidierungsmotivs mit dem Reporter-gen-System

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führte die Expression einer Volllängesequenz von OspA zu einem Vitalitätsverlust transplastomer Pflanzen, während die Expression verkürzter, unlipidierter Varianten in einer hohen Proteinakkumulation resultierte. Aus diesem Grund sollte das Lipidierungspotential unterschiedlich langer Varianten der bakteriellen Signalsequenz von OspA geklärt und damit ein zur Lipidierung in den Plastiden minimales Lipidierungsmotiv bestimmt werden. Dadurch sollte gegebenenfalls der negative Effekt der Akkumulation einer Volllängesignalsequenz an den Membranen des Thylakoidsystems umgangen werden und dennoch eine lipidierete Variante des rekombinanten Proteins nach plastidärer Expression erhalten werden. Da die Lokalisation rpOspAs in Abhängigkeit der anwesenden Signalsequenz innerhalb der Pflanzenzelle bislang nur durch immunologischen Nachweis der isolierten Zellkompartimente aufgezeigt werden konnte, sollte durch Fusion der unterschiedlich langen Signalsequenzen an YFP ein Reporter-gen-System generiert werden, mit dessen Hilfe anhand der visuellen Lokalisation der Lipidierungsstatus des Reporterproteins geklärt werden sollte. Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen wie zum Beispiel GFP oder DsRed bieten die Möglichkeit einer makroskopischen Detektion der Transgenaktivität und –lokalisierung und konnten erfolgreich für pflanzliche und tierische Zellen durchgeführt werden (Harper et al., 1999; Ruiz-Velasco & Ikeda, 2001). Im Falle des pflanzlichen G-Proteins GPα1 konnte die Lipidierung des Proteins aufgrund der Lokalisation einer YFP-Fusion an der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden (Adjobo-Hermans, 2006).

Zum Zweck der visuellen Lokalisation war das Reporter-gen *yfp* im Vorfeld im Rahmen einer Diplomarbeit (Hennig, 2006) mit drei Sequenzen, die für unterschiedlich lange N-terminale Signalpeptide des OspA kodierten (Tab. 3.6), in den Expressionsvektor pRB95 kloniert und transplastome Pflanzen der Linien YFP11, YFP12 und YFP13 generiert worden. Wie sich bei der Charakterisierung homoplastischer Pflanzen herausstellte, war das rekombinante Reporterprotein während des Pflanzenwachstums nicht stabil. Durchgehend starke Transkriptionsraten konnten sowohl für Pflanzen aus der Zellkultur als auch für Pflanzen, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert wurden, verzeichnet werden (Borkowski, 2007). Eine Proteinakkumulation von YFP war jedoch lediglich in sehr jungen Pflanzen, die auf MS-Medium kultiviert wurden, und in den Keimblättern nachzuweisen (Borkowski, 2007).



**Tabelle 3.6. Signalsequenzen der YFP-Reporter-gen-Konstrukte.** Aufgeführt sind die N-terminalen Signalsequenzen der YFP-Reporter-gen-Konstrukte im Vergleich zur Originalsequenz von OspA.

Konstrukt	N-terminale Signalsequenz
OspA	MKKYLLGIGLILALIACK...
YFP11	MEKYLLGIGLILALIACK...
YFP12	M                      ALIACK...
YFP13	M                      ACK...

Aufgrund der geringen Proteinakkumulation in den zur Verfügung stehenden Pflanzen des Reporter-gen-Systems fanden generierte YFP-Pflanzen nur begrenzt zur Charakterisierung verwendeter Sequenzmotive Verwendung und konnten lediglich zur *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten herangezogen werden (Kap. 3.1.3.6).

Inwieweit die geringe Akkumulation von YFP auf eine unzureichende Translation des gebildeten Transkripts oder auf eine Degradation durch endogene Proteasen zurückzuführen war, konnte nicht bestimmt werden (Borkowski, 2007).

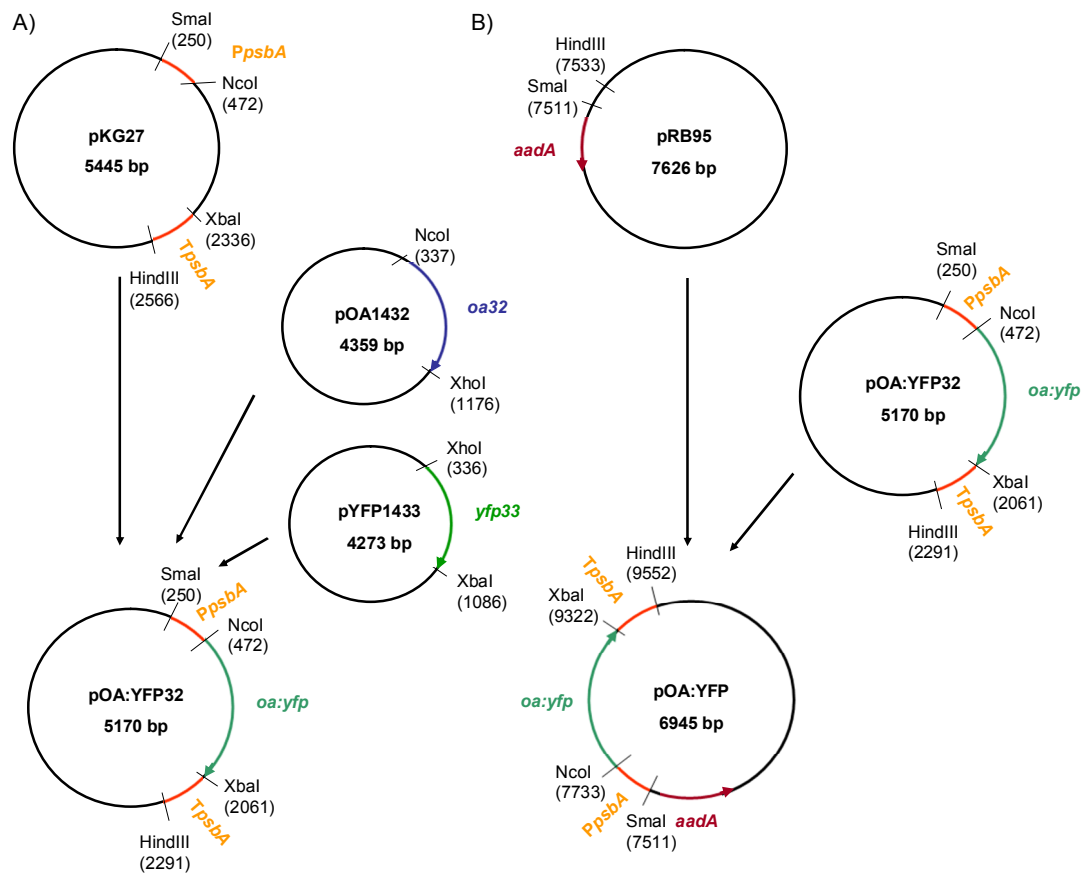
Da das bakterielle Protein OspA nachweislich ein sehr Protease-resistentes Molekül ist (Luke et al, 1997) und für synthetisiertes rpOspA bisher keine *in vivo*-Degradation des Proteins bekannt ist, sollte durch eine Fusion des Reporterproteins YFP an OspA eine mögliche Degradation von YFP nach plastidärer Expression umgangen und die Stabilität des Reporterproteins gewährleistet werden. Zu diesem Zweck wurde eine Fusion aus *ospa* und *yfp* erzeugt, die nach Expression in transplastomen Pflanzen visuell innerhalb der Chloroplasten lokalisiert werden sollte.

#### 3.1.3.1 Klonierung einer OspA:YFP-Fusion

Zur Klonierung einer Fusion aus OspA und Reporterprotein YFP erfolgte die Amplifikation der Sequenzen *ospa* und *yfp* mit den Primern POA for *NcoI* und POA211 beziehungsweise PYFP105 und Py1.1 rev mittels PCR. Als Matrize zur Amplifikation dienten jeweils 1 ng Plasmid pOA4413 und pYFP4413. Durch die verwendeten Primerkombinationen wurden der Volllängesequenz von *ospa* eine *NcoI*-Schnittstelle am N-Terminus und eine *XhoI*-Schnittstelle direkt strangaufwärts der für den His-tag kodierenden Sequenz angefügt. Für YFP resultierte ein Amplifikat ohne Lipidierungssequenz mit C-terminaler *XhoI*-Schnittstelle. Direkt strangabwärts der für den His-tag kodierenden Sequenz folgte eine *XbaI*-Schnittstelle. Die etwa 800 bp großen PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, aus der Agarose-Matrix gereinigt und zur Klonierung in den Klonierungsvektor pCR-blunt verwendet. Daraus resultierten die Plasmide pOA1432 und pYFP1433, die zur Transformation von Zellen von *E. coli* verwendet wurden. Gewachsene Kolonien wurden mit den zur Amplifikation verwendeten Primerpaaren auf die Anwesenheit des Transgens überprüft und über Nacht in Flüssigmedium kultiviert. Von den Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert und die korrekte Nukleotidsequenz der Konstrukte durch eine Sequenzierung mit den Primern PM13 for und PM13 rev bestätigt.

Zur Klonierung in den Subklonierungsvektor pKG27, in dem die Integration der Gene unter die regulatorischen Elemente 3'- und 5'-*psbA* erfolgte, wurden die Fragmente der Größe 800 bp *oa32* und *yfp33* mit den Enzymen *NcoI* und *XhoI* beziehungsweise *XhoI* und *XbaI* aus den Klonierungsvektoren isoliert (Abb. 3.16 A). Das aus der Ligation mit dem *NcoI/XbaI*-geschnittenen Vektor pKG27 resultierende Plasmid pOA:YFP32 diente der Transformation von Zellen von *E. coli*. Mittels PCR-Screening wurden gewachsene Kolonien auf die Anwesenheit des Inserts überprüft. Die im Anschluss isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Enzymen *SmaI* und *HindIII* verdaut und das etwa 2 kb große Restriktionsfragment mittels Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert. Das Insert stand nun zur Ligation in den Vektor pRB95 zur Verfügung, der zuvor mit den Enzymen *SmaI* und *HindIII* linearisiert worden war (Abb. 3.16 B). Aufgrund der mangelnden Transgenexpression, die unter der Kontrolle des *atpI*-Promoters von Vektor pRB96 für die Lipobox-Konstrukte erzielt worden war, wurde als Chloroplastenexpressionsvektor auf Vektor pRB95 zurückgegriffen. Unter der Kontrolle des hier vorliegenden *psbA*-Promoters war in dieser Arbeit bereits die quantitative Proteinakkumulation der Konstrukte OA13, OA14, OT12 und OT13 beschrieben worden. Der neu generierte Chloroplastenexpressionsvektor pOA:YFP konnte schließlich zur Transformation von Zellen von *E. coli* verwendet werden. Isolierte Plasmid-DNA

gewachsener Kolonien wurde zur Kontrolle mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* verdaut. Eine positive Kultur wurde zur Anfertigung einer Midi-Präparation von Plasmid-DNA über Nacht in 100 ml Kulturmedium angezogen und die DNA am folgenden Tag isoliert. Diese wurde zur Verifizierung noch einmal mit den Enzymen *XbaI* und *NcoI* verdaut, bevor die Nukleinsäurekonzentration bestimmt werden konnte.



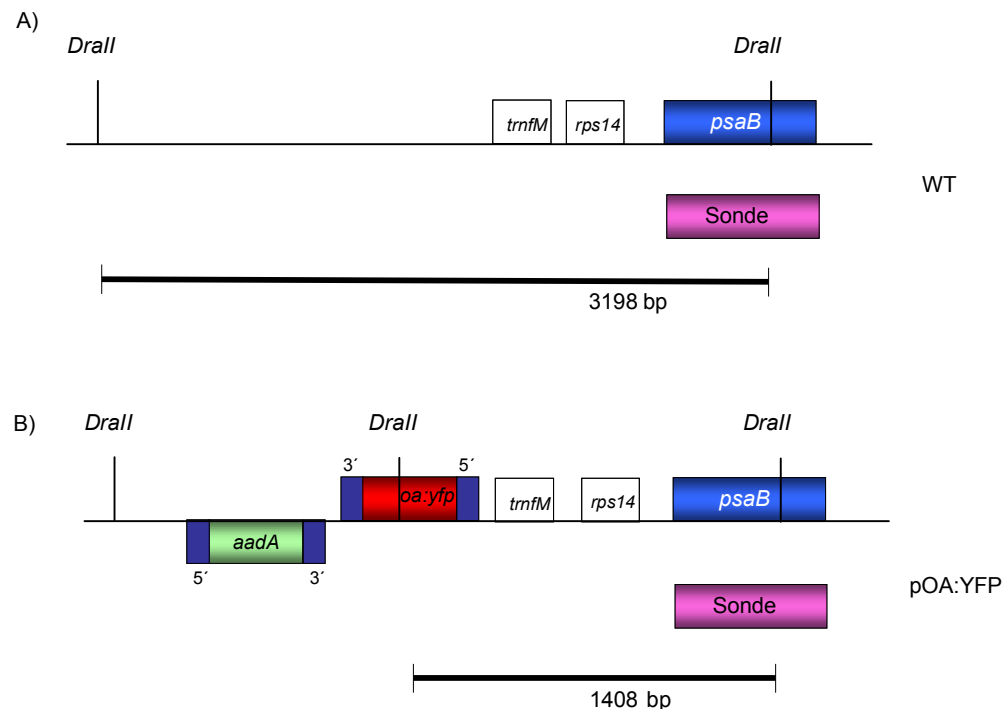
**Abbildung 3.16. Schema zur Klonierung des Konstrukts OA:YFP.** A) Die Inserts *oa* und *yfp* wurden mittels *NcoI/XhoI*-Verdau bzw. *XhoI/XbaI*-Verdau aus den Klonierungsvektoren pOA1432 und pYFP1433 isoliert und zur Ligation mit Vektor pKG27 verwendet. B) Durch einen Verdau des Vektors pOA:YFP32 mit *SmaI* und *HindIII* wurde das Konstrukt *oa:yfp* mit den regulatorischen Elementen 3'-*psbA* und 5'-*psbA* versehen und stand zur Ligation in den Chloroplastentransformationsvektor pRB95 zur Verfügung.

### 3.1.3.2 Stabile Chloroplastentransformation

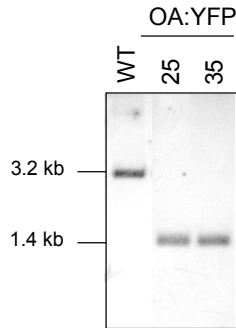
Die Präparation der Mikropartikel und die anschließende Transformation des Chloroplastengenoms mit der Genegun erfolgten analog zur Transformation mit den Lipobox-Konstrukten (Kap 3.1.2.2). Die Detektion der ca. 800 bp großen Transgene mittels PCR erfolgte mit den Primerkombinationen POspA for *NcoI* / POA211 und PYFP105 / PY1.1 rev.

### 3.1.3.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen

Die Identifizierung homoplastischer Pflanzen erfolgte mittels RFLP-Analyse analog wie für die Lipobox-Konstrukte beschrieben (Kap. 3.1.2.3). Aufgrund des verwendeten Expressionsvektors pRB95 entstanden nach enzymatischem Verdau der DNA mit *DraII* Restriktionsfragmente der Größe 3.2 kb (WT-Genom) und 1.4 kb (transgenes Genom), die durch Hybridisierung mit einer *psaB*-komplementären Sonde detektiert werden konnten (Abb. 3.17).



**Abbildung 3.17. Schema der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) von OA:YFP-Pflanzen.** A) Nach einem Verdau von WT-DNA mit *DraII* liegt das *psaB*-Gen (blau unterlegt) auf einem 3198 bp großen Restriktionsfragment. Die Detektion von *psaB* erfolgte mittels einer DIG-dUTP markierten Sonde (lila unterlegt). B) Durch die zusätzliche *DraII*-Schnittstelle innerhalb des Transgens (rot unterlegt) erfolgte die Hybridisierung der Sonde nach einem Verdau isolierter DNA von OA:YFP-Pflanzen mit einem nur 1408 bp großen Restriktionsfragment.

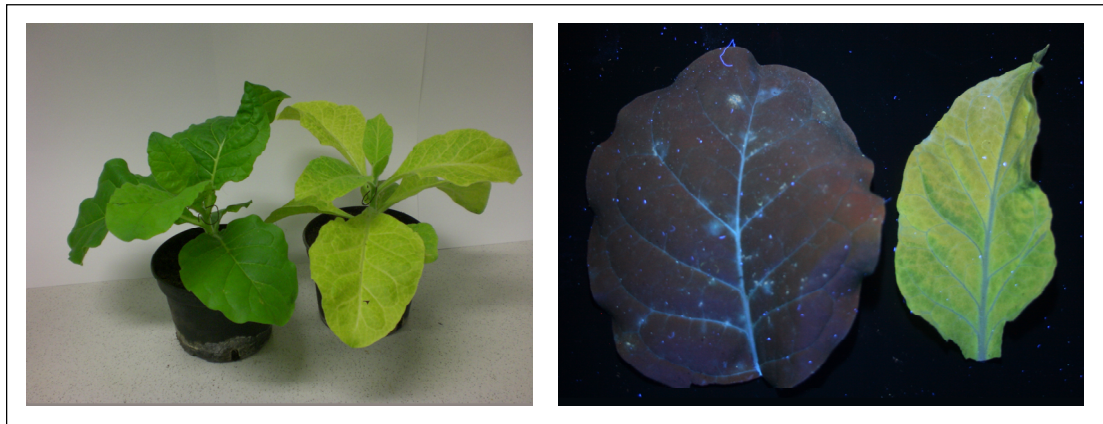


**Abbildung 3.18. Ergebnis der RFLP-Analyse von OA:YFP-Pflanzen.** Aufgetragen wurde DNA von zwei verschiedenen OA:YFP-Pflanzenlinien (Linie 25 und 35). Als Negativkontrolle diente isolierte DNA von WT-Pflanzen von *Nicotiana tabacum*. Während für das WT-Chloroplastengenom eine Bande der Größe 3.2 kb detektiert wurde, konnte für die beiden Linien 25 und 35 nur eine Bande der Größe 1.4 kb detektiert werden. Somit befanden sich diese Pflanzen in einem homoplastischen Zustand und konnten zur Bewurzelung auf MS-Medium kultiviert werden.

Pflanzen, die als homoplastisch identifiziert worden waren (Abb. 3.18), wurden auf MS-Medium bewurzelt und unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur oder im Gewächshaus kultiviert.

#### 3.1.3.4 Charakterisierung des Phänotyps

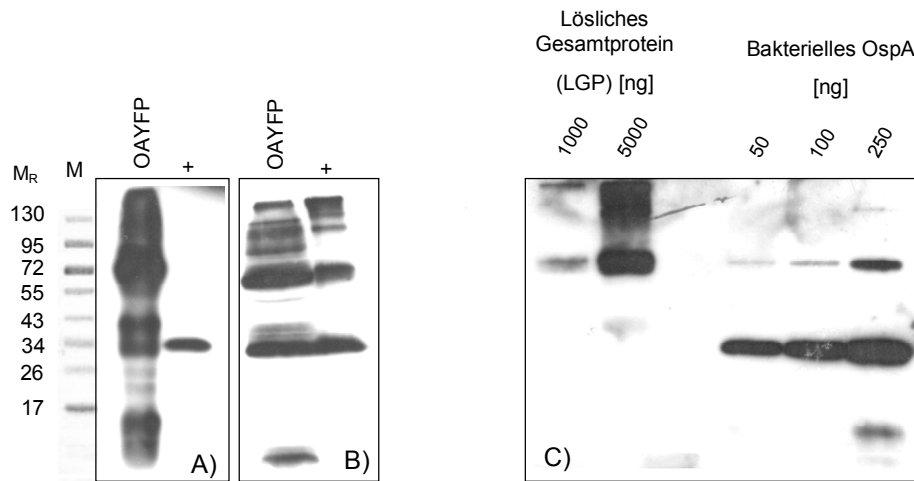
OA:YFP-Pflanzen, die unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur kultiviert wurden, waren phänotypisch nicht von WT-Pflanzen zu unterscheiden. Bei der Kultivierung im Gewächshaus zeichneten sie sich jedoch im Vergleich zu WT- oder OT12-/OT13-Pflanzen durch eine gelbliche Färbung der Blätter aus, die unter UV-Licht durch die charakteristische Fluoreszenz von YFP gekennzeichnet waren (Abb. 3.19). Wie sich herausstellte, waren diese Pflanzen nur begrenzt zur Kultivierung auf Erde fähig. Im Vergleich zu den PS II-geschädigten Pflanzen OA13 oder OA14 zeigten sie keine sofortige Degradation nach einem Transfer von MS-Medium auf Erde, konnten aber unter Gewächshausbedingungen nur schwer zur Blüte gebracht werden. Zur Samenbildung wurden daher einige Individuen der OA:YFP-Pflanzen nach der Bewurzelung auf Nährlösung gesetzt und in der Zellkultur kultiviert.



**Abbildung 3.19. Phänotyp der OA:YFP-Pflanzen.** Abgebildet sind zwei ca. acht Wochen alte Pflanzen der Linien OA12 (links im Bild) und OA:YFP (rechts im Bild) sowie ein Blatt jeder Pflanze unter UV-Licht (Blatt OA12 links, Blatt OA:YFP rechts). Charakteristisch für OAYFP-Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert wurden, war ein gelblicher Farbton der Blätter im Unterschied zu WT- oder OA12-Pflanzen und die unter UV-Licht charakteristische Fluoreszenz von YFP.

#### 3.1.3.5 Nachweis der Proteinsynthese

Ein erster Nachweis der Synthese von rekombinantem YFP in den generierten OA:YFP-Pflanzen konnte durch visuelle Betrachtung der Blätter unter UV-Licht erfolgen (Abb. 3.19). Zum Nachweis der Fusion des synthetisierten Proteins aus OspA und YFP wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurde Pflanzenmaterial geerntet und ein Gesamtproteinextrakt erzeugt. Dieser wurde einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und die Proteine im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte sowohl mit monoklonalem anti-OspA-Antikörper als auch mit monoklonalem anti-GFP-Antikörper als Primärantikörper. Als Positivkontrolle diente je nach gewähltem Primärantikörper gereinigtes, bakterielles OspA oder gereinigtes, transient exprimiertes YFP. Da OA:YFP eine Fusion aus den Molekülen OspA und YFP mit einer molaren Masse von 31 bzw. 27 kg/Mol darstellte, war im Immunoblot eine Bande entsprechend der relativen Molekülmasse von  $58 \times 10^3$  zu erwarten. Wie sich zeigte, konnte eine Bande der entsprechenden Molekülmasse für transplastome OA:YFP-Pflanzen detektiert werden (Abb. 3.20 A, B). Auch bei wiederholten Untersuchungen von älteren oder auf Erde kultivierten Pflanzen konnte die Anwesenheit des rekombinanten Proteins im



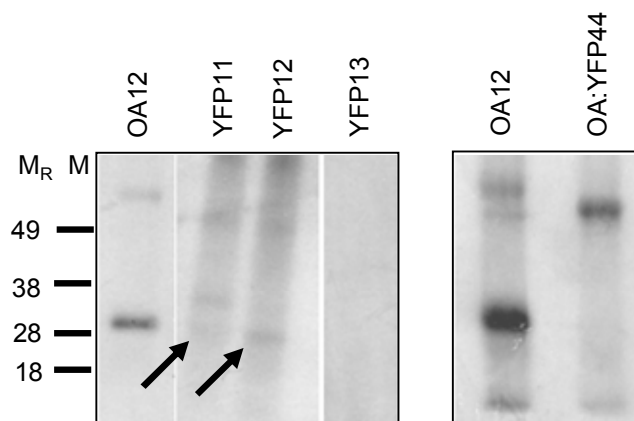
**Abbildung 3.20. Immunodetektion von rekombinantem OA:YFP.** A) Detektion von OA:YFP in transgenem Pflanzenmaterial mit anti-OspA-Antikörper. +: 0.5 µg gereinigtes OspA aus *E. coli*. B) Detektion von OA:YFP mit anti-GFP-Antikörper. +: 5 µg gereinigtes YFP. C) Semiquantitative Proteinbestimmung von OA:YFP transplastomer Pflanzen. Aufgetragen wurden 1000 ng und 5000 ng LGP transplastomer OA:YFP-Pflanzen sowie 50 ng, 100 ng und 250 ng gereinigtes rekombinantes OspA aus *E. coli*. Die Detektion erfolgte mittels anti-OspA-Antikörper. M: Proteinmarker; M<sub>R</sub>: Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

Blattextrakt bestätigt werden. Eine Degradation oder eine geringe Translationsrate des Proteins in den generierten Pflanzen konnte ausgeschlossen werden.

Zur Bestimmung des Gehalts an akkumuliertem Protein wurde die Methode der semiquantitativen Proteinbestimmung, wie sie für transplastome OspA-Pflanzen beschrieben wurde (Kap. 3.1.1.1), gewählt. Die Intensität der Bande von 5000 ng LGP konnte mindestens mit der Intensität der 250 ng-Bande von rbOspA gleichgesetzt und der Gehalt an rekombinantem Protein somit auf einen Anteil von 5% bis 10% des LGP bestimmt werden (Abb. 3.20 C). Der Gehalt von 10% des LGP entsprach dem, der in transplastomen OA13- und OA14-Pflanzen gemessen werden konnte. Allerdings waren diese Pflanzen aufgrund der Akkumulation des Proteins an den Thylakoidmembranen nicht zu einem photoautotrophen Wachstum befähigt. Diese Erscheinung traf jedoch nicht auf OA:YFP-Pflanzen zu: Zwar war das Wachstum der transgenen Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen beeinträchtigt, dennoch war die Zunahme an Biomasse ohne die Zufuhr exogener Zucker möglich.

### 3.1.3.6 *In vivo*-Isotopenmarkierung

Zum Nachweis der Lipidierung des Fusionsproteins OA:YFP sowie der Reporterprotein-Konstrukte YFP11, YFP12 und YFP13 wurden intakte Protoplasten erster Pflanzen der Linien YFP11-13 und Protoplasten homoplastischer OA:YFP-Pflanzen isoliert und in Anwesenheit von  $[9,10\text{-}^3\text{H}]$  Palmitinsäure inkubiert. Metall-Affinitätschromatographie der Zelllysate und Elektrophorese gereinigter Proteine erfolgten wie bereits für transplastome OspA-Pflanzen beschrieben (Kap. 3.1.1.2). Da zur Protoplastenisolierung Pflanzen verwendet wurden, die unter UV-Licht eine YFP-charakteristische Fluoreszenz zeigten, entfiel ein immunologischer Nachweis der YFP-Akkumulation. Die Filme der Isotopenmarkierung der Reporter-Gen-Konstrukte zeigten nach der Entwicklung eine Bande entsprechend der relativen Molekülmasse von  $27 \times 10^3$  für YFP12 (Abb. 3.21) sowie eine sehr schwache Bande für YFP11 entsprechend der relativen Molekülmasse von  $27 \times 10^3$  beziehungsweise  $54 \times 10^3$  entsprechend einem YFP-Dimer. Für Konstrukt YFP13 mit stark verkürzter Signalsequenz konnte keine Lipidierung mit Palmitinsäure nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Da die Signalsequenz von YFP11 eine Variation einer Volllängesequenz von OspA darstellte, entspricht die detektierte Lipidierung den Erwartungen. Für die verkürzte Signalsequenz des Konstrukts YFP12 bedeutet das Ergebnis, dass allein das Vorhandensein der Lipobox ALIACK als Lipidierungssignal im Plastiden erkannt wird und auf die Anwesenheit der OspA- Volllängesignalsequenz verzichtet werden kann.



**Abb.3.21. Fluorographische Detektion der *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten von YFP-Reporter-Gen-Pflanzen und OA:YFP-Pflanzen.** Als Positivkontrolle dienten isolierte Protoplasten der Linie OA12. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Banden der relativen Molekülmasse von  $27 \times 10^3$ , die für Konstrukt YFP11 und YFP12 detektiert werden konnten. Deutlicher erkennbar konnte für beide Konstrukte die charakteristische Dimerband mit der relativen Molekülmasse von  $58 \times 10^3$  detektiert werden.

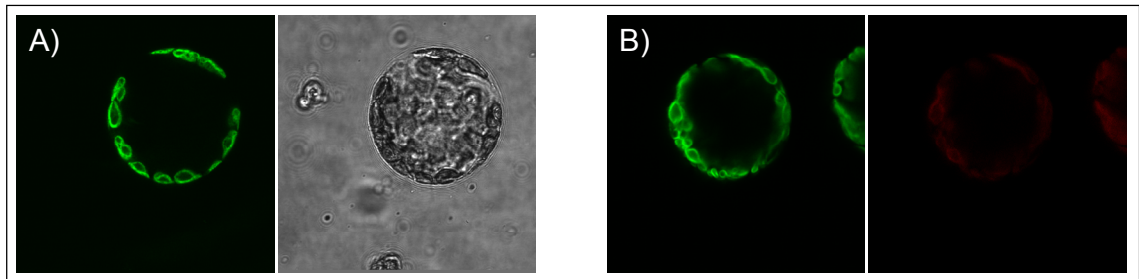


Eine weitere Verkürzung der Signalsequenz um die Aminosäuren Alanin (A), Leucin (L) und Isoleucin (I) führte zu keiner Lipidmodifikation, wie anhand von Konstrukt YFP13 dargelegt werden konnte. Inwieweit es unter dem Einfluss der Lipidierung von YFP12 zu einer Akkumulation des Proteins an den Thylakoiden und zu einer Störung der Photosynthesefunktion wie für nachweislich lipidierte OspA-Varianten kommt, konnte aufgrund der mangelnden Stabilität des Reporterproteins in transplastomen Pflanzen nicht weiter untersucht werden.

Die fluorographische Detektion der Isotopenmarkierung des OspA:YFP-Fusionsproteins zeigte eine deutliche Bande entsprechend der relativen Molekülmasse von  $58 \times 10^3$  (Abb. 3.21). Diese entspricht dem Fusionsprotein und bestätigte dessen posttranslationale Modifikation mit Palmitinsäure.

#### 3.1.3.7 Visuelle Lokalisation der Reporterproteine mittels CLSM

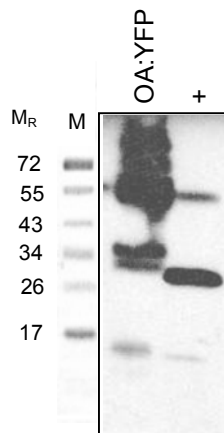
Die Grundidee der Reporter-gen-Konstrukte war neben der Ermittlung eines minimalen Lipidierungsmotivs die visuelle Detektion des Proteins innerhalb der Zellen transgener Pflanzen. Aufgrund der geringen Stabilität des Proteins nach plastidärer Expression war dieses Vorhaben nur sehr eingeschränkt möglich. Durch die Fusion an OspA konnte das Reporterprotein jedoch bei Synthese im Chloroplasten stabilisiert werden. Die Zellen generierter OA:YFP-Pflanzen standen damit zur visuellen Analyse an einem konfokalen Lasermikroskop (CLSM) zur Verfügung. Dafür wurden zunächst intakte Protoplasten transplastomer Pflanzen isoliert und diese in MSTM-Puffer suspendiert zur Mikroskopie verwendet. Wie auf den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist, konnte die Lokalisation des Proteins anhand seiner Fluoreszenz eindeutig innerhalb der Chloroplasten bestimmt werden (Abb. 3.22 A). Dabei war YFP nicht gleichmäßig in den Zellkompartimenten verteilt, sondern aggregierte bevorzugt an den Membranen. Ein Vergleich der Lokalisation der YFP-Fluoreszenz innerhalb der Plastiden mit der Chlorophyllfluoreszenz zeigte eine Deckung beider fluoreszierender Moleküle (Abb. 3.22 B), so dass die Lokalisation des Reporterproteins in den Chloroplasten bestätigt werden konnte. Da keine transplastome Pflanze, die eine stabile Form von YFP ohne N-terminale Signalsequenz akkumulierte, für eine vergleichende Untersuchung zur Verfügung stand, konnte keine Aussage über die Lokalisation des Lipoproteins in Abhängigkeit des Lipidrests getroffen werden.



**Abbildung 3.22. Visuelle Lokalisation von OA:YFP.** Dargestellt sind CLSM-Aufnahmen zweier isolierter Protoplasten von OA:YFP-Pflanzen. A) Detektion der YFP-Fluoreszenz und Durchlichtbild eines Protoplasten. B) Detektion von YFP- und Chlorophyllfluoreszenz eines Protoplasten.

#### 3.1.3.8 Thylakoidisolierung

Zur Bestätigung der visuellen Lokalisation des rekombinanten, fluoreszierenden Proteins an den Membranen der Plastiden wurde zusätzlich eine Isolation der Thylakoidmembranen vorgenommen. Die Aufreinigung der Membranen und der anschließende Immunoblot erfolgten wie bereits beschrieben (Kap. 3.1.1.6). Zur Detektion des Proteins wurde ein anti-OspA-Antikörper verwendet. Wie nachgewiesen werden konnte, lag das rekombinante Protein OA:YFP in Assoziation zu den Membranen des Thylakoidsystems vor (Abb. 3.23). Dieses Ergebnis entspricht dem Resultat, das für OspA mit variierenden Vollängesignalsequenzen (OA12, OA13) erzielt werden konnte.



**Abbildung 3.23. Immunoblot isolierter Thylakoide einer OA:YFP-Pflanze.** Zur Bestimmung der Lokalisation von OA:YFP innerhalb der Chloroplasten wurden 20  $\mu$ l isolierter Thylakoidmembranen zur Immunoblot-Analyse verwendet. Als Positivkontrolle wurde 0.5  $\mu$ g gereinigtes rekombinantes OspA aus *E. coli* aufgetragen. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels anti-OspA-Antikörper. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

Rückblickend auf die vorliegenden Untersuchungsergebnisse wird klar, dass das Reporter-gen-System im ursprünglichen Sinn zur visuellen Detektion nicht verwendet werden konnte. In Kombination mit einem stabilisierenden Faktor, wie einem Protease-resistenten Protein, ist es jedoch möglich, den Einfluss bakterieller Signalpeptide auf die Eigenschaften rekombinanter Reporterproteine zu untersuchen. Trotz der geringen Proteinakkumulation des Reporterproteins konnte in dieser Arbeit ein zur Lipidmodifikation minimales Lipidierungsmotiv identifiziert werden.

## 3.2 Transiente Expression

Die Erzeugung transplastomer Pflanzen ist ein langwieriger Prozess, der von der Transformation bis zur Kultivierung einer homoplastischen Pflanze neun bis zwölf Monate dauert. Eine Alternative zur stabilen Transformation von Chloroplasten mittels Genegun stellt die transiente Expression von Genen in Pflanzenzellen dar. Für die vorliegende Arbeit wurden die beiden 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH20030 des ICON-Systems (ICON Genetics) zur Coinfiltration mit entsprechenden 3'-Pro-Vektor-Modulen und dem Rekombinations-Modul 10881 zur transienten Expression verwendet (Kap. 1.3.2). Damit bot sich eine alternative Möglichkeit zur Expression von Konstrukten, die nach stabiler Chloroplastentransformation aufgrund einer mangelnden Proteinsynthese nicht weiter untersucht werden konnten (YFP-Reporterger- und Lipobox-Konstrukte). Zusätzlich sollte unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 ein direkter Vergleich zwischen posttranslationaler Modifikation von Signalsequenzen im Chloroplasten und im Cytosol für Konstrukte stattfinden, deren Lipidierungsstatus nach plastidärer Expression bereits bekannt war (OA14 und YFP12).

### 3.2.1 Transiente Expression von rekombinantem OspA

Die stabile plastidäre Expression war nicht für alle vorgesehenen Konstrukte möglich und scheiterte für Lipobox-Konstrukte an einer zu geringen Promoteraktivität (Kap.3.1.2). Aus diesem Grund sollte eine Untersuchung entsprechender Konstrukte nach transienter Expression unter Verwendung des 5'-Chloroplasten-Targeting-Moduls des Vektors pICH20030 erfolgen. Für einen direkten Vergleich möglicher Unterschiede bei der Modifikation rekombinanter Lipoproteine in den unterschiedlichen Zellkompartimenten Chloroplast und Cytosol erfolgte zusätzlich die transiente Expression der Signalsequenzen von OA14 und YFP12 anhand der Konstrukte OA24 und OT25.

Zur transienten Expression wurden folgende Konstrukte verwendet (Tab. 3.7): Die Sequenz von *oa25* kodierte für ein OspA mit Volllängesignalsequenz, während *oa24* der Sequenz der OspA-Variante OA14 entsprach (Tab. 3.1). Die Sequenz von *ot25* hingegen kodierte für ein OspA mit der verkürzten N-terminalen Signalsequenz MALIACK. Diese entspricht der Sequenz des Reporterprotein-Konstrukts YFP12. Nachdem eine Lipidierung von YFP in Abhängigkeit dieser Signalsequenz nach plastidärer Expression nachgewiesen worden war (Kap. 3.1.3.6), scheiterten weitere Untersuchungen an der geringen

Proteinakkumulationsrate des Reporterproteins. Aus demselben Grund wurden auch die Sequenzen der Lipobox-Konstrukte Lip11, Lip12 und Lip13 (Tab. 3.7) zur transienten Expression verwendet. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen dieser Konstrukte wurden nach der Klonierung in die Vektoren des ICON-Systems in Lip21, Lip22 und Lip23 umbenannt.

Für alle genannten Konstrukte galt es, die Möglichkeit einer Lipidierung der rekombinanten Proteine unter Verwendung des 5'-Chloroplasten-Targeting-Moduls zu klären. Damit sollte das Potential des transienten Expressionssystems zur Produktion reaktiver Antigene als Alternative zur stabilen Chloroplastentransformation getestet werden. Gegebenenfalls sollten dabei Unterschiede bei posttranslationaler Modifikation im Cytosol (in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH15879) oder nach Transport in die Chloroplasten (in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH 20030) aufgedeckt werden. Für die Konstrukte OA24 und OT25 sollte unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 ein direkter Vergleich der Prozessierung identischer Signalsequenzen nach plastidärer Expression und Expression im Zellkern erfolgen.

#### 3.2.1.1 Klonierung der OspA-Konstrukte für die transiente Expression

Für die transiente Expression war bereits im Vorfeld die OspA-Variante OA25 in das 3'-Pro-Vektor-Modul pICH10990 kloniert worden (Hennig, 2006). Der resultierende Vektor pOA6125 stand damit zur transienten Expression zur Verfügung.

Zur Klonierung des Konstrukts OT25 wurde die 800 bp große Nukleotidsequenz *ot25* mit den Primern POA128 und POAhis rev in der PCR mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Als Matrize diente 1 ng des Plasmids pOA4413 (Hennig, 2006). Die resultierende Nukleotidsequenz wurde durch das zur Amplifikation verwendete Primerpaar mit einer *Bsal*-Schnittstelle am N-Terminus und einem 6× Histidin-tag gefolgt von einer *Xba*I-Schnittstelle am C-Terminus versehen und kodierte für eine OspA-Variante mit verkürzter N-terminaler Signalsequenz der Form MALIACK. Die Sequenzierung von *ot25* erfolgte nach der Klonierung in den Subklonierungsvektor pCR-blunt. Aus diesem konnte das Fragment anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bsa*I und *Xba*I isoliert und zur weiteren Klonierung in den mit den identischen Enzymen geöffneten Vektor pICH10990 verwendet werden. Der aus der Ligation resultierende Vektor wurde pOT6125 benannt.

Die Nukleotidsequenzen der übrigen für die transiente Expression vorgesehenen Konstrukte

wurden mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XbaI* aus den Vektoren pOA3214 (Hennig, 2006), pLip3211, pLip3212 und pLip3213 isoliert und zur Ligation mit dem Vektor pICH11599 verwendet. Dieser war im Vorfeld ebenfalls mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* linearisiert worden. Aus der Ligation resultierten die Plasmide pOA6324, pLip6321, pLip6322 und pLip6323. Die Ligationsansätze dienten zur Transformation von Zellen von *E. coli*. Transformierte Zellen wurden auf Carbenicillin-haltigen LB-Platten kultiviert und Kolonien mit den entsprechenden Primerpaaren (Tab.3.7) auf die Anwesenheit des Transgens überprüft. Positive Kolonien wurden anschließend in Flüssigmedium kultiviert und zur Isolation der Plasmid-DNA verwendet. Diese wurde durch einen Verdau mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* auf ihre Identität überprüft und stand nun zur Transformation von Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* zur Verfügung. Die Zellen wurden nach der Transformation für zwei bis drei Tage auf LB-Platten, die zur Selektion die Antibiotika Rifampicin, Gentamycin und Carbenicillin enthielten, kultiviert. Kolonien wurden per PCR-Colony-Screen mit den entsprechenden Primerkombinationen (Tab. 3.7) auf die Anwesenheit des Inserts geprüft und positive Kolonien zur Infiltration in 100 ml Flüssigmedium bei 28°C kultiviert. Entsprechend der 3'-Pro-Vektor-Module wurden die 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH20030 sowie Vektor pICH10881 zur Transformation von *A. tumefaciens* verwendet.

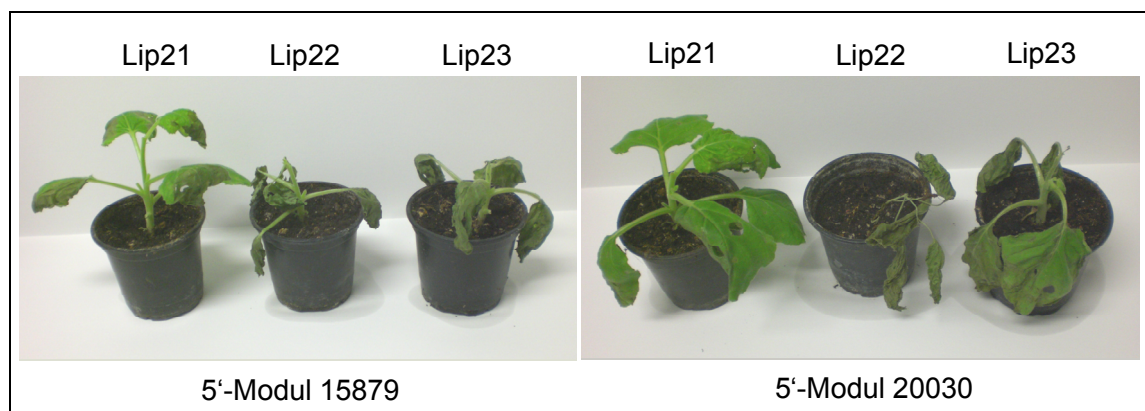
**Tabelle 3.7. Konstrukte für die transiente Expression.** Angegeben sind die zur transienten Expression verwendeten OspA- und Lipobox-Konstrukte mit den korrespondierenden N-terminalen-Signalsequenzen sowie die resultierenden 3'-Pro-Vektor-Module und die zur Klonierung verwendeten Primerpaare.

Konstrukt	N-terminale Signalsequenz	3'-Pro-Vektor-Modul	Primer for	Primer rev
OA25	MAKYLLGIGLILALIACK...	pOA6125	POA126	POAhis rev
OA24	MAKYLLGIGLILALIAGK...	pOA6324	POAdeltaC	POAhis rev
OT25	M                      ALIACK...	pOT6125	POA128	POAhis rev
Lip21	MVLHFLLGVACY...	pLip6321	PLip131	POAhis rev
Lip22	MGIHLFLSGVACFGRS...	pLip6322	PLip132	POAhis rev
Lip23	MVSVFGFIACCFVRS...	pLip6323	PLip133	POAhis rev

Die Infiltration von *N. benthamiana* Pflanzen mit den generierten 3'-Modulen und den jeweiligen 5'-Modulen erfolgte wie unter Kapitel 2.6.4.2 beschrieben. Jedes Konstrukt wurde sowohl in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 15879 als auch mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 20030 und dem Rekombinationsmodul 10881 zur Infiltration verwendet. Infiltrierte Pflanzen wurden bis zur Ernte des Blattmaterials sechs bis neun Tagen unter Dauerlicht und einer Temperatur von 26°C kultiviert.

#### 3.2.1.2 Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis von rekombinantem OspA

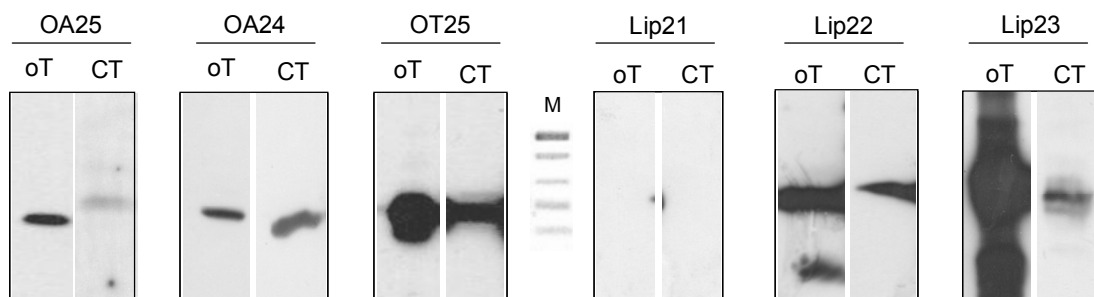
Die Entwicklung der Pflanzen nach der Infiltration war sehr unterschiedlich und vom verwendeten 3'-Modul abhängig. Einige Pflanzen entwickelten drei bis fünf Tage nach der Infiltration Nekrosen um die Infiltrationsstelle, andere welkten trotz ausreichender Wasserversorgung stark. Eine rasche Degradation des infiltrierten Blattmaterials konnte vor allem für Konstrukte Lip22, Lip23 und OA24 festgestellt werden (Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24. *N. benthamiana* Pflanzen sieben Tage nach der Infiltration mit Lipobox-Konstrukten.** Die Lipobox-Konstrukte Lip21, Lip22 und Lip23 wurden in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 15879 (links) und dem 5'-Pro-Vektor-Modul 20030 (rechts) infiltriert. Nach sieben Tagen zeigten Blätter der Lip21-Pflanzen nekrotische Bereiche; eine Akkumulation des rekombinanten Proteins in diesen Pflanzen konnte nicht detektiert werden. Lip22- und Lip23-Pflanzen welkten nach der Infiltration sehr rasch. Proteinakkumulation konnte sowohl in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 15879 als auch mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 20030 detektiert werden.

Sieben Tage nach der Infiltration wurde stichprobenartig ca. 150 mg Blattmaterial aus der Blattspreite infiltrierter Blätter mit einem Korkbohrer entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Gewinnung eines Gesamtproteinextrakts verwendet. Von diesem wurden 20 µl zu einer SDS-PAGE mit anschließender Immunodetektion herangezogen. Dabei konnte für beinahe alle verwendeten Kombinationen eine Proteinakkumulation nachgewiesen werden (Abb.3.25). Die Proteinakkumulation schwankte dabei stark zwischen einzelnen Infiltrationsereignissen und war vom verwendeten 3'-Modul abhängig. Bei einem Vergleich der Immunoblots der drei OspA-Konstrukte OA25, OA24 und OT25 (Abb. 3.25) ließ sich folgende Tendenz erkennen: i) Unabhängig von der verwendeten N-terminalen Sequenz des Transgens war die Proteinakkumulation bei Verwendung des 5'-Moduls mit Chloroplasten-Targeting geringer als bei Verwendung eines 5'-Moduls ohne Targeting-Peptid. ii) Die Proteinakkumulation von Konstrukten mit N-terminaler Volllängesignalsequenz (OA25 und OA24) war weniger effizient als die Expression eines Konstrukts mit verkürzter Signalsequenz (OT25).

Für die transiente Expression der Lipobox-Konstrukte Lip22 und Lip23 konnte ebenfalls eine verminderte Proteinakkumulation unter Verwendung des Chloroplasten-Targeting-Moduls festgestellt werden. Für beide Konstrukte war jedoch ein starkes Welken der infiltrierten Pflanzen zu beobachten (Abb. 3.24). Dagegen zeigten infiltrierte Lip21-Pflanzen keine Welkungserscheinungen; für diese Pflanzen war es jedoch nicht möglich zu irgendeinem Zeitpunkt eine Akkumulation des rekombinanten Proteins nachzuweisen (Abb. 3.25).



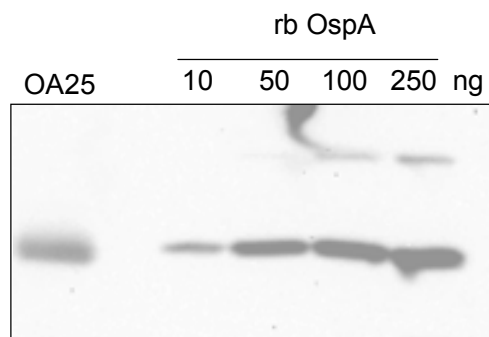
**Abbildung 3.25. Detektion von rekombinantem OspA mittels Immunoblot nach transienter Expression.** Zur Infiltration verwendete 3'-Module waren OA25, OA24, OT25, Lip21, Lip22 und Lip23. Jedes 3'-Modul wurde dabei jeweils in Kombination mit dem 5'-Modul ohne Targeting-Sequenz (Pro-Vektor-Modul pICH15879, oT) und dem 5'-Modul mit Chloroplasten-Targeting (Pro-Vektor-Modul pICH20030, CT) zur Infiltration von *N. benthamiana* verwendet. Die Ernte des infiltrierten Blattmaterials erfolgte sieben Tage nach der Infiltration. Die Detektion von rekombinantem OspA erfolgte mittels anti-OspA-Antikörper. oT: 5'-Modul ohne Targeting-Sequenz (pICH15879); CT: 5'-Modul mit Chloroplasten-Targeting-Sequenz (pICH20030); M: Proteinmarker mit den entsprechenden relativen Molekülmassen (von oben nach unten) von 72, 55, 43, 34 und 26  $\times 10^3$ .



Aufgrund der allgemein geringen Proteinakkumulation nach transienter Expression und der starken Degradation der Blätter war eine Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten zur Untersuchung einer Lipidmodifikation der Konstrukte nicht möglich. Es konnten daher keine Aussagen zum Vorliegen einer Lipidierung nach transienter Expression getroffen werden.

#### 3.2.1.3 Proteinakkumulation nach transienter Expression

Zum Vergleich der Proteinakkumulationsrate rekombinanten OspAs zwischen transplastomen Pflanzen und nach transienter Expression mit dem 5'-Modul 15879 wurde eine semiquantitative Proteinbestimmung von transient exprimiertem oa25 durchgeführt. Dazu wurde das Blattmaterial infiltrierter Pflanzen sieben Tage nach der Infiltration geerntet und in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Nach der Extraktion des löslichen Gesamtproteins wurden 20 µl des Proteinextrakts mit definierten Mengen an rekombinantem OspA aus *E. coli* einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot unterzogen. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels anti-OspA-Antikörper (Abb. 3.26). Ein Vergleich der Bandenintensität ergab eine Übereinstimmung des Proteinextrakts mit 100 ng gereinigtem OspA. Da von 300 µl Proteinextrakt (100 mg Pflanzenmaterial versetzt mit 200 µl Extraktionspuffer) 20 µl aufgetragen wurden, entspricht das einer Menge von 1500 ng rekombinantem OspA im Gesamtextrakt. Berücksichtigt man die Tatsache, dass der Gesamtextrakt aus 100 mg infiltriertem Blattmaterial erzeugt wurde, lässt sich der Gehalt an rekombinantem Protein OA25 auf 1.5 µg/100 mg [FG] oder 15 µg/1 g [FG] infiltriertem Blattmaterial berechnen. Geht man von einem endogenen Proteingehalt von 10 mg Protein pro 1 g FG aus, ergibt das einen prozentualen Anteil von 0.15% rekombinantem OA25 am LGP.



**Abbildung 3.26. Semiquantitative Proteinbestimmung von rekombinantem OspA (OA25).** Aufgetragen wurden 20 µl eines Proteinextrakts von Pflanzen, die sieben Tage zuvor mit Konstrukt OA25 in Kombination mit dem 5'-Modul 15879 infiltriert worden waren und definierte Mengen an gereinigtem, rekombinantem OspA aus *E. coli*. Berechnungen des Proteingehalts ergaben einen Anteil von 0.15% OA25 am LGP. Die detektierten Banden entsprechen einer relativen Molekülmasse von  $31 \times 10^3$ .

Vergleicht man diesen Wert mit dem von Marillonnet *et al.* (2004, 2005) erzielten Gehalt von 80% des LGP für transient exprimiertes *gfp*, oder mit dem Gehalt von 1%-10% an rekombinantem OspA des LGP transplastomer Pflanzen, erscheinen die resultierenden 0.15% OA25 nach transients Expression gering.

#### 3.2.2 Transiente Expression der Reporter-gen-Konstrukte

Wie auch im Falle der Lipobox-Konstrukte war eine Untersuchung rekombinanten Proteins nach plastidärer Expression der Reporter-gen-Konstrukte aufgrund der geringen Proteinakkumulationsrate nicht möglich. Um dennoch das Potential eines Reporter-gen-Systems zur Bestimmung des Lipidierungsstatus rekombinanter Proteine anhand einer visuellen Lokalisation zu beurteilen, war ein zur transienten Expression vorgesehenes Reporter-gen-System erstellt worden. Dieses sollte zusätzlich zur Analyse des Lipidierungspotentials unterschiedlich langer Signalsequenzen bei transients Expression dienen. Die zur transienten Expression vorgesehenen Konstrukte (Tab. 3.8) waren dafür bereits im Vorfeld als *Bsal/Xba*I-Fragmente kloniert und zur Ligation in das 3'-Pro-Vektor-Modul pICH10990 verwendet worden, so dass zu Beginn dieser Arbeit bereits transgene Bakterienkulturen zur Infiltration mit den beiden verschiedenen 5'-Modulen der Vektoren pICH15879 und pICH20030 zur Verfügung standen. Die verwendeten Signalsequenzen (Tab. 3.8) entsprachen dabei einer Volllängesignalsequenz von OspA mit einem Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Alanin (A) an Position zwei für Konstrukt YFP21 und drei verkürzten Varianten der bakteriellen Signalsequenz für die Konstrukte YFP22-24: Für YFP22 resultierte eine Sequenz, die um elf Aminosäuren zwischen Startmethionin (M) und Lipobox (ALIACK) verkürzt war, während die Signalsequenz des Konstrukts YFP23 um drei weitere Aminosäuren reduziert war (MACK). Für Konstrukt YFP24 erfolgte ein Austausch der Aminosäuren innerhalb der verkürzten Signalsequenz von YFP23 an Position zwei von Alanin (A) zu Glycin (G). Damit resultierte aus der N-terminalen Sequenz des Konstrukts YFP24 ein eukaryotisches Lipidierungssignal (Smotrys & Linder, 2004), das der Signalsequenz von Konstrukt OT12 der Chloroplastentransformation entsprach. Für alle bereits beschriebenen Konstrukte blieb die zur Lipidmodifikation essentielle Aminosäure Cystein erhalten. Im Falle des Reporter-gen-Konstrukts YFP25 erfolgte eine komplette Kürzung der N-terminalen Signalsequenz, so dass das entsprechende Konstrukt für YFP ohne N-terminales Signalpeptid kodierte. Alle erzeugten Reporter-gen-Konstrukte waren zusätzlich mit einem Histidin-Tag am C-Terminus versehen.

**Tabelle 3.8. Zur transienten Expression verwendete YFP-Reportergen-Konstrukte.** Aufgeführt sind die YFP-Reportergen-Konstrukte mit den entsprechenden N-terminalen Signalsequenzen. Zum Vergleich ist die bakterielle Vollängesignalsequenz von OspA angegeben.

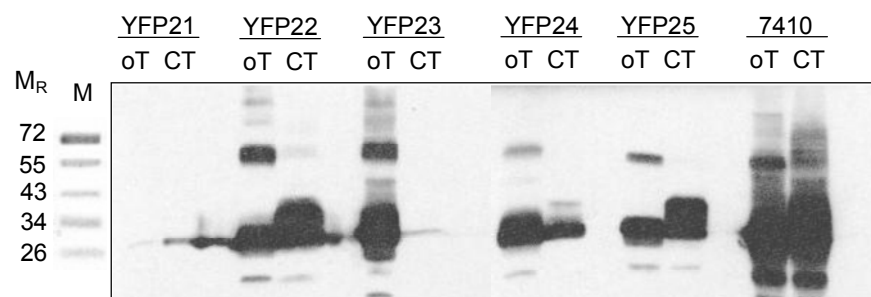
Konstrukt	N-terminale Signalsequenz
OspA	MKKYLLGIGLILALIACK...
YFP21	MAKYLLGIGLILALIACK...
YFP22	MALIACK...
YFP23	MACK...
YFP24	MGCK...
YFP25	M...

#### 3.2.2.1 Infiltration und Proteinsynthese der Reportergen-Konstrukte

Die Infiltration von *N. benthamiana* mit den genannten Reportergen-Konstrukten erfolgte sowohl mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH15879 ohne Targeting-Sequenz als auch mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH20030 mit Chloroplasten-Targeting-Sequenz. Als Positivkontrolle diente das 3'-Pro-Vektor-Modul pICH7410 (Marillonnet et al., 2004), das für das Reporterprotein GFP ohne jegliche N-terminale Signalsequenz kodierte. Die Infiltration der Pflanzen erfolgte wie beschrieben (Kap. 2.6.4.2). Wie auch für transient exprimierte OspA-Varianten konnten nach der Infiltration Nekrosen an den Infiltrationsstellen oder das Welken ganzer Pflanzen beobachtet werden.

Die Synthese des Reporterproteins konnte fünf bis sieben Tage nach Infiltration der Pflanzen zunächst visuell durch Betrachtung infiltrierter Blätter unter UV-Licht anhand der charakteristischen Fluoreszenz von YFP/GFP bestätigt werden. Dabei konnte eine flächige Fluoreszenz des Proteins unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 beobachtet werden, während die Verteilung des Proteins in Abhängigkeit des Chloroplasten-Targeting-Moduls

punktuell sichtbar war. Für Konstrukt YFP21 konnte keine Fluoreszenz infiltrierter Blätter festgestellt werden, ebenso für Konstrukt YFP23 mit Chloroplasten-Targeting-Modul 20030. Die Detektion des rekombinanten Proteins im Blattmaterial erfolgte neben der Visualisierung des fluoreszierenden Moleküls nach Anregung durch UV-Licht zusätzlich mittels Immunoblot-Analyse mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper. Dazu wurde ein Gesamtproteinextrakt des infiltrierten Blattmaterials erstellt und dieser wie beschrieben zur elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot herangezogen (Kap. 2.6.3.1 und 2.6.3.4). Die Detektion des Proteins mit der molaren Masse von 27 kg/Mol erfolgte mit einem anti-GFP-Primärantikörper. Als Ergebnis konnte für die Konstrukte YFP23 und YFP24 eine verstärkte Akkumulation rekombinanten Proteins unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 im Vergleich zum Chloroplasten-Targeting-Modul von Vektor pICH20030 detektiert werden, die durch die Anwesenheit von Dimer-Banden entsprechend der relativen Molekülmasse von  $54 \times 10^3$  charakterisiert war (Abb. 3.27). Der Trend einer erhöhten Proteinakkumulation mit Modul 15879 konnte bereits für transient exprimierte OspA-Konstrukte beobachtet werden (Kap. 3.2.1.2). Unter den Reportergen-Konstrukten stellte Konstrukt YFP21, das für ein YFP mit bakterieller Volllängesignalsequenz kodierte, eine Ausnahme dar: Weder in Kombination mit Chloroplasten-Targeting-5'-Modul 20030 noch mit 5'-Modul 15879 konnte eine Bande detektiert werden, die eindeutig auf die Anwesenheit von YFP21 in der Probe zurückzuführen wäre (Abb. 3.27).



**Abbildung 3.27. Immunoblot zur Detektion von rekombinantem YFP nach transienter Expression.** Aufgetragen wurde ein Gesamtproteinextrakt von Pflanzen, die mit den 3'-Modulen YFP21, YFP22, YFP23, YFP24, YFP25 und dem Kontrollvektor pICH7410 jeweils in Kombination mit dem 5'-Modul 20030 und 15879 infiltriert worden waren. Die Detektion von YFP und GFP erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ ; oT: Koinfiltration mit dem 5'-Modul 15879 ohne Targeting-Sequenz; CT: Koinfiltration mit dem 5'-Modul 20030 mit Chloroplasten-Targeting-Sequenz.

Ebenso konnte für Konstrukt YFP23 in Kombination mit dem Chloroplasten-Targeting-Modul kein Protein im Immunoblot detektiert werden; unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 war YFP jedoch im infiltrierten Blattmaterial nachweisbar. Für alle weiteren Konstrukte sowie für das Kontrollmodul 7410 konnte YFP beziehungsweise GFP im Blattmaterial infiltrierter Pflanzen detektiert werden.

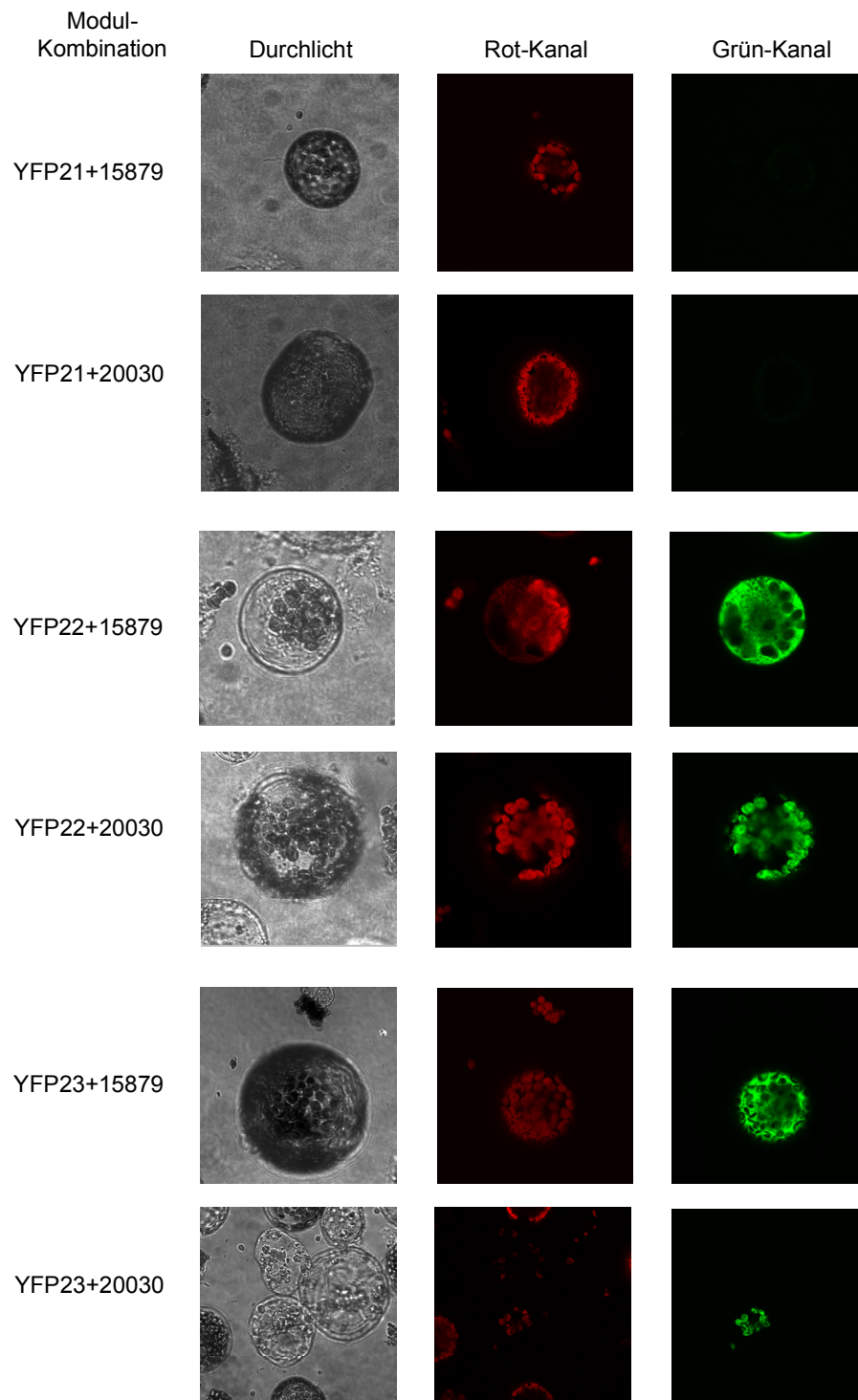
Für Konstrukte YFP22 und YFP25 konnte in Kombination mit dem 5'-Chloroplasten-Targeting-Modul eine etwas größere Bande entsprechend der relativen Molekülmasse von ca.  $30 \times 10^3$  mit dem spezifischen GFP-Antikörper detektiert werden. Diese kann möglicherweise auf Protein zurückzuführen sein, dass entweder noch nicht in die Chloroplasten transloziert wurde und daher die plastidäre Targeting-Sequenz aufweist oder in epidermalen Zellen synthetisiert wird, die im Allgemeinen keine Chloroplasten besitzen.

#### 3.2.2.2 Lokalisation des Reporterproteins nach transienter Expression

Zur visuellen Detektion des synthetisierten Proteins innerhalb der Zelle wurde infiltriertes Pflanzenmaterial unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurde zunächst eine Isolation von Protoplasten aus dem infiltrierten Blattmaterial vorgenommen. Diese wurden in MSTM-Puffer aufgenommen und zur Mikroskopie an einem konfokalen Lasermikroskop (CLSM) verwendet. Nach Anregung durch einen Argon-Laser erfolgte die Detektion der Fluoreszenz von Chlorophyll (Rot-Kanal) und GFP/YFP (Grün-Kanal) bei einem Spektrum von 640-680 nm beziehungsweise 500-540 nm.

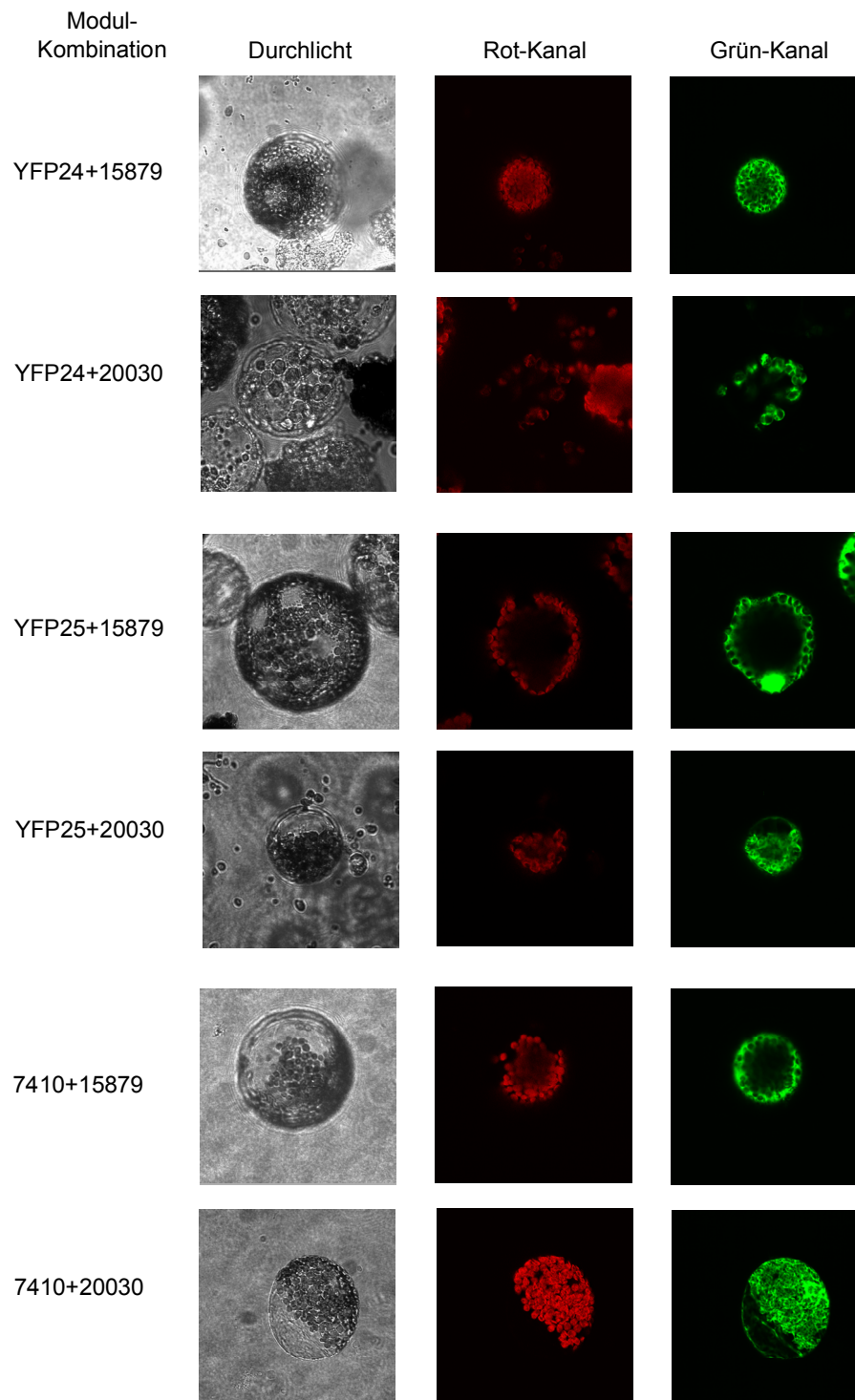
Wie in Abbildung 3.28 und 3.29 zu sehen ist, konnte die Lokalisation des rekombinanten Proteins YFP22 bis YFP25 in Abhängigkeit des verwendeten 5'-Moduls im Cytosol oder in den Chloroplasten bestätigt werden, während YFP21 nicht detektiert werden konnte. Zur Bestimmung der Lokalisation des Reporterproteins innerhalb der Chloroplasten erfolgte eine digitale Vergrößerung dieser Zellkompartimente (Abb. 3.30). Dadurch konnte eine strukturelle Akkumulation des Reporterproteins innerhalb der Chloroplasten detektiert werden. Diese konnte in gleicher Weise für alle untersuchten Konstrukte beobachtet werden. Eine mögliche, durch einen Lipidrest bedingte Assoziation zu bestimmten Membrankompartimenten, konnte daher nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse

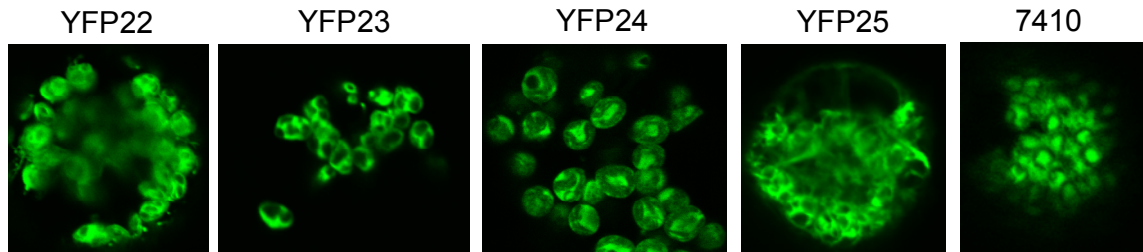


**Abbildung 3.28. Mikroskopische Untersuchung zur Lokalisation rekombinanten YFPs infiltrierter Pflanzen am CLSM.** Abgebildet sind isolierte Protoplasten von *N. benthamiana*, die mit den 3'-Modulen YFP21, YFP22 und YFP23 und den beiden 5'-Modulen 15879 und 20030 infiltriert worden waren. Linke Bildreihe: Durchlichtaufnahme isolierter Protoplasten; Rot-Kanal: Detektion der Chlorophyllfluoreszenz; Grün-Kanal: Detektion der Fluoreszenz von rekombinantem YFP.

### 3. Ergebnisse



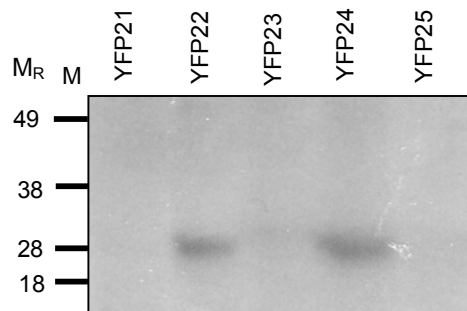
**Abbildung 3.29. Mikroskopische Untersuchung zur Lokalisation rekombinanten YFPs infiltrierter Pflanzen am CLSM.** Abgebildet sind isolierte Protoplasten von *N. benthamiana*, die mit den 3'-Modulen YFP24, YFP25 und Kontrollmodul 7410 und den beiden 5'-Modulen 15879 und 20030 infiltriert worden waren. Linke Bildreihe: Durchlichtaufnahme isolierter Protoplasten; Rot-Kanal: Detektion der Chlorophyllfluoreszenz; Grün-Kanal: Detektion der Fluoreszenz von rekombinanten YFP/GFP.



**Abbildung 3.30. Mikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von rekombinantem YFP in Chloroplasten nach transienter Expression.** Abgebildet sind Chloroplasten isolierter Protoplasten von *N. benthamiana*, die mit den Reportergen-Konstrukten YFP22, YFP23, YFP24, YFP25 und dem Kontrollmodul 7410 jeweils in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 20030 infiltriert worden waren.

### 3.2.2.3 *In vivo*-Isotopenmarkierung

Zur Untersuchung des Lipidierungsstatus der Reportergen-Konstrukte nach transienter Expression wurde eine *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten, wie bereits für transplastome *OspA*-Pflanzen beschrieben (Kap. 3.1.1.2), durchgeführt. Da die Proteinakkumulation des rekombinanten Proteins unter Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls 20030 für eine *in vivo*-Isotopenmarkierung zu gering war, erfolgte die Isolation der Protoplasten nur für Pflanzen, die in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul 15879 infiltriert worden waren.



**Abbildung 3.31. Fluorographische Detektion der *in vivo*-Isotopenmarkierung isolierter Protoplasten der Reportergen-Konstrukte nach transienter Expression.** Aufgetragen wurden isolierte Protoplasten von Pflanzen, die mit den Konstrukten YFP21 bis YFP25 in Kombination mit dem 5'-Modul 15879 infiltriert worden waren. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der realtiven Molekülmasse  $\times 10^3$ .



Die fluorographische Detektion inkorporierter Palmitinsäure folgte nach sechswöchiger Inkubation des Films bei -80°C. Eine Inkorporation der Tritium-markierten Palmitinsäure konnte für das Genprodukt der Reporterger-Konstrukte YFP22 und YFP24 nachgewiesen werden (Abb. 3.31). Die entsprechenden Signalsequenzen MALIACK (YFP22) und MGCK (YFP24) werden daher als Lipidierungssignal nach Expression im Zellkern von *N. benthamiana* erkannt. Das Resultat der Variante YFP24 mit eukaryotischem Lipidierungsmotiv entspricht dem Ergebnis von Konstrukt OT22, für das eine Inkorporation von Palmitinsäure unter Einfluss einer identischen Signalsequenz bereits bestätigt werden konnte (Hennig, 2006). Für die Signalsequenz MALIACK von Konstrukt YFP22 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits eine Lipidierung nach Expression im Chloroplasten anhand von Konstrukt YFP12 nachgewiesen werden (Kap. 3.1.3.6). Mit dem vorliegenden Ergebnis konnte nun gezeigt werden, dass die Signalsequenz MALIACK sowohl im Chloroplasten als auch im Cytosol als Lipidierungssignal erkannt wird. Im Gegensatz zur stabilen Chloroplastentransformation konnte im Versuch mit den Reporterger-Konstrukten in Anwesenheit der bakteriellen Volllängesignalsequenz (YFP21) keine entsprechende Bande detektiert werden. Aufgrund der mangelnden Proteinakkumulation, die im Immunoblot und in den mikroskopischen Untersuchungen beobachtet werden konnte, lässt sich keine Aussage über eine Lipidmodifikation von YFP21 treffen. Ebenso resultierte die verkürzte Sequenz MACK (YFP23) nicht in einer Palmitoylierung des synthetisierten Proteins nach transienter Expression, gleichsam wie Konstrukt YFP25 ohne N-terminales Signalpeptid. Zusammenfassend war es anhand der Untersuchung des Reporterger-Systems möglich, zwei zur Lipidmodifikation nach transienter Expression funktionelle Lipidierungsmotive zu bestimmen.

### 3.3 Immunogenität von transgenem OspA-Pflanzenmaterial

Das immunogene Potential konnte für plastidäres OspA (OA12) transplastomer Tabak-Pflanzen bereits bestätigt werden: Eine parenterale Immunisierung von Mäusen mit dem gereinigten Protein führte dabei zu einer Immunantwort und der Bildung protektiver Anti-OspA-Antikörper (Glenz et al., 2006).

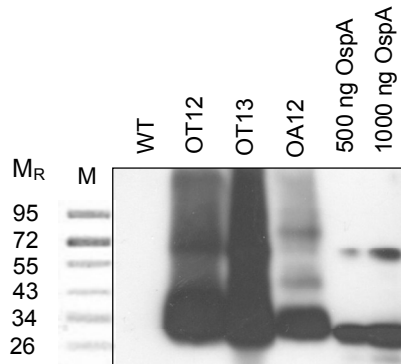
Da eine orale Applikation von Pflanzenmaterial aufwendige Aufreinigungsverfahren und den Gebrauch von Spritzen und Kanülen ausschließt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, ob eine orale Applikation des rekombinanten plastidären Proteins ebenfalls zu einer Bildung reaktiver Antikörper führt.

#### 3.3.1 Pfropfung von transplastomen Tabakpflanzen und Bestimmung des endogenen Nikotingehalts

Aufgrund des hohen Gehalts des toxischen Alkaloids Nikotin in allen Pflanzenteilen sind transgene Tabakpflanzen nicht zur oralen Applikation geeignet. Um die transplastomen Pflanzen dennoch für initiale Fütterungsversuche verwenden zu können, war es daher notwendig, den Nikotingehalt in den Pflanzen zu reduzieren. Da die Wurzel der Tabakpflanze den Syntheseort des Alkaloids darstellt, von wo aus die systemische Verteilung in alle Pflanzenteile erfolgt, sollte durch eine Pfropfung der Tabakspresse der Nikotingehalt in den Blättern der Pflanze gesenkt werden. Zur Pfropfung wurde die Tomatenpflanze *Solanum lycopersicum* TA 234 verwendet, die wie *N. tabacum* ebenfalls zur Gattung der Nachtschattengewächse (Solanaceae) gehört.

Zunächst wurden Samen von WT-Pflanzen und der transplastomen Linien OA12, OT12 und OT13 zusammen mit Samen von *Solanum lycopersicum* TA 234 auf Erde ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Nach acht bis zwölf Wochen wurden Pflanzen mit vergleichbar stark ausgeprägter Sprossachse für die Pfropfungen ausgewählt. Die Pfropfung erfolgte wie unter Kapitel 2.6.1.3 beschrieben.

Um sicherzustellen, dass eine Pfropfung keinen entscheidenden Einfluss auf die Akkumulation des rekombinanten Proteins innerhalb des Pflanzenmaterials nimmt, wurde der Gehalt an rekombinantem Protein im Blattmaterial gepfropfter Pflanzen überprüft. Dafür wurde aus 100 mg Blattmaterial gepfropfter WT-, OT12-, OT13- und OA12-Pflanzen mit 200 µl Proteinextraktionspuffer ein Gesamtproteinextrakt erstellt und 20 µl dieses Extrakts



**Abbildung 3.32. Immunoblot von Gesamtprotein gepfropfter OspA-Pflanzen.** Aufgetragen wurden 20 µl Gesamtproteinextrakt gepfropfter OspA- und WT-Pflanzen sowie definierte Mengen von rekombinantem OspA aus *E. coli*. Die Anwesenheit von rpOspA im gepfropften Pflanzenmaterial konnte somit bestätigt und eine pfropfungsbedingte Abnahme der Proteinakkumulation ausgeschlossen werden. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

mit definierten Mengen an gereinigtem OspA einem Immunoblot unterzogen (Abb. 3.32). Die im Immunoblot detektierten Banden entsprechend der relativen Molekülmasse von  $31 \times 10^3$  bestätigten die Akkumulation von rpOspA im Pflanzenmaterial. Ein Vergleich der Bandenintensität von OA12 und 1000 ng gereinigtem OspA lassen den Anteil von rpOspA am LGP transplastomer, gepfropfter Pflanzen auf mind. 1% des LGP berechnen, während die Bandenintensität des OT12-Extrakts geschätzt eine mindestens 10-fach höhere Intensität im Vergleich zur OA12-Bande aufwies. Eine pfropfungsbedingte Abnahme des Gehalts an rekombinantem Protein konnte somit ausgeschlossen werden.

Das Blattmaterial gepfropfter Pflanzen wurde anschließend geerntet und in flüssigem Stickstoff pulverisiert, bevor es unter Vakuum gefriergetrocknet wurde. Die Bestimmung des Nikotingehalts des gefriergetrockneten Materials erfolgte mittels GC-MS-Analyse unter der Anleitung von Dr. Markus Krischke am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Julius-von-Sachs-Instituts in Würzburg. Zur Analyse verwendet wurde Material von vier gepfropften WT- und sechs gepfropften OA12-Pflanzen sowie von jeweils drei nicht gepfropften WT- und OA12-Pflanzen. Die Bestimmung des Gehalts an Nikotin in der Probe erfolgte bezüglich des internen Standards D4-Nikotin unter Berücksichtigung eines Response-Faktors von 1.174. Berechnete Nikotinkonzentrationen der untersuchten Pflanzen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Die durchschnittliche Konzentration an Nikotin in nicht-gepfropftem Blattmaterial wurde dabei für WT-Pflanzen mit 4.2 mg/g TG bestimmt, während die Konzentration für nicht-gepfropfte OA12-Pflanzen bei einem Wert von 4.4 mg/g TG lag.

**Tabelle 3.9. Bestimmung des Nikotingehalts gepfropfter Tabakpflanzen.** Erste Spalte: Zur Bestimmung des Nikotingehalts mittels GC-MS-Analyse verwendetes Pflanzenmaterial. Zweite Spalte: Einwaage des Pflanzenmaterials in mg Trockengewicht. Dritte Spalte: Mittels GC-MS-Analyse berechneter Gehalt an Nikotin [ $\mu\text{g}$ ] in der analysierten Probe. Vierte Spalte: Berechnete Konzentration von Nikotin in  $\mu\text{g}$  pro Gramm Trockengewicht des eingewogenen Blattmaterials.

Probe	Einwaage [mg TG]	Menge Nikotin [ $\mu\text{g}$ ]	Konzentration Nikotin [ $\mu\text{g/g TG}$ ]
WT#1	24.9	73.84	2965.65
WT#2	14.5	75.34	5196.11
WT#3	14.6	63.98	4382.42
OA#1	15.7	73.61	4688.3
OA#2	14.9	52.96	3554.69
OA#3	15.3	77.77	5083.14
WT#1 Pfropf	100.6	22.17	220.34
WT#2 Pfropf	100.4	1.28	12.74
WT#3 Pfropf	100.6	17.23	171.31
WT#4 Pfropf	99.8	1.35	13.58
OA#1 Pfropf	99.5	1.22	12.23
OA#2 Pfropf	100.8	2.21	21.93
OA#3 Pfropf	100.1	2.69	26.91
OA#4 Pfropf	100.3	14.2	141.53
OA#7 Pfropf	100.8	0.93	9.27
OA#8 Pfropf	99.9	15.43	154.41

Eine deutliche Reduktion des endogenen Nikotingehalts konnte für das Blattmaterial gepfropfter Pflanzen gemessen werden. Hier lag der durchschnittliche Gehalt für WT-Pflanzen bei 104.5  $\mu\text{g/g TG}$  und für OA12-Pflanzen sogar nur bei 61  $\mu\text{g/g TG}$ . Eine gepfropfte Pflanze weist damit einen durchschnittlichen Gehalt an Nikotin von 78  $\mu\text{g/g TG}$  auf. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, lässt sich sagen, dass eine Pfropfung von Tabakspossen auf Tomatensprossachsen eine durchschnittliche Reduktion des Nikotingehalts von 98% bedingt. Da die mittlere letale Dosis von Nikotin (LD50) für Mäuse bei einem Wert von 3 mg/kg Körpergewicht liegt (das entspricht einer Dosis von 60  $\mu\text{g}$  Nikotin bei einem durchschnittlichen Gewicht einer Maus von etwa 20 g), der durchschnittliche Nikotingehalt gepfropfter Tabakpflanzen wie gezeigt bei 78  $\mu\text{g/g TG}$  liegt,

konnte eine orale Verabreichung von bis zu 700 mg gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial an die Versuchstiere toleriert werden. Die Bereitstellung von Pflanzenmaterial für die Fütterungsversuche war damit gewährleistet.

#### 3.3.2 Fütterungsversuche an Mäusen

Erste Vorversuche zur oralen Immunisierung mit Blattmaterial transplastomer, gepfropfter OA12-Pflanzen wurden von Prof. Markus Simon am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg an BALB/c-Mäusen durchgeführt. Zur oralen Immunisierung wurde einer ersten Versuchsgruppe (Tab. 3.10), bestehend aus drei Tieren, gefriergetrocknetes Blattmaterial gepfropfter Pflanzen der Linie OA12 entsprechend einem OspA-Gehalt von 5 µg mittels Schlundsonde verabreicht. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 1% OspA des LGP transplastomer OA12-Pflanzen entspricht das einer Menge von 5 mg gefriergetrocknetem Blattmaterial, das an die Versuchstiere verfüttert wurde (Abb. 3.33). Die mittlere letale Dosis für Nikotin von 700 mg wurde dabei deutlich unterschritten, so dass ein letaler Effekt des Alkaloids auf die Versuchstiere ausgeschlossen werden konnte. Einer zweiten Versuchstiergruppe (Tab. 3.10), bestehend aus drei Tieren, wurde 5 µg gereinigtes rekombinantes OspA aus *E. coli* in 500 µl PBS-Puffer oral per Schlundsonde verabreicht. Die Immunisierungen erfolgten an den Tagen 0, 7, 14, 29, 67, 68, 69, 88, 89, 90, 120, 121 und 122. Der Nachweis gebildeter Antikörper im Blut der Versuchstiere mittels ELISA wurde an den Tagen 22, 36, 77, 99 und 130 erbracht. Zur Kontrolle wurde eine dritte Gruppe (Tab. 3.10), bestehend aus zwei Versuchstieren, mit 5 µg gereinigtem rekombinantem OspA aus *E. coli* in 100 µl PBS-Puffer durch subkutane Injektion an den Tagen 0, 7, 14, 29 und 88 immunisiert. Blutproben dieser Versuchstiere wurden an den Tagen 22, 36 und 99 entnommen und mittels ELISA auf OspA-spezifische Antikörper untersucht.

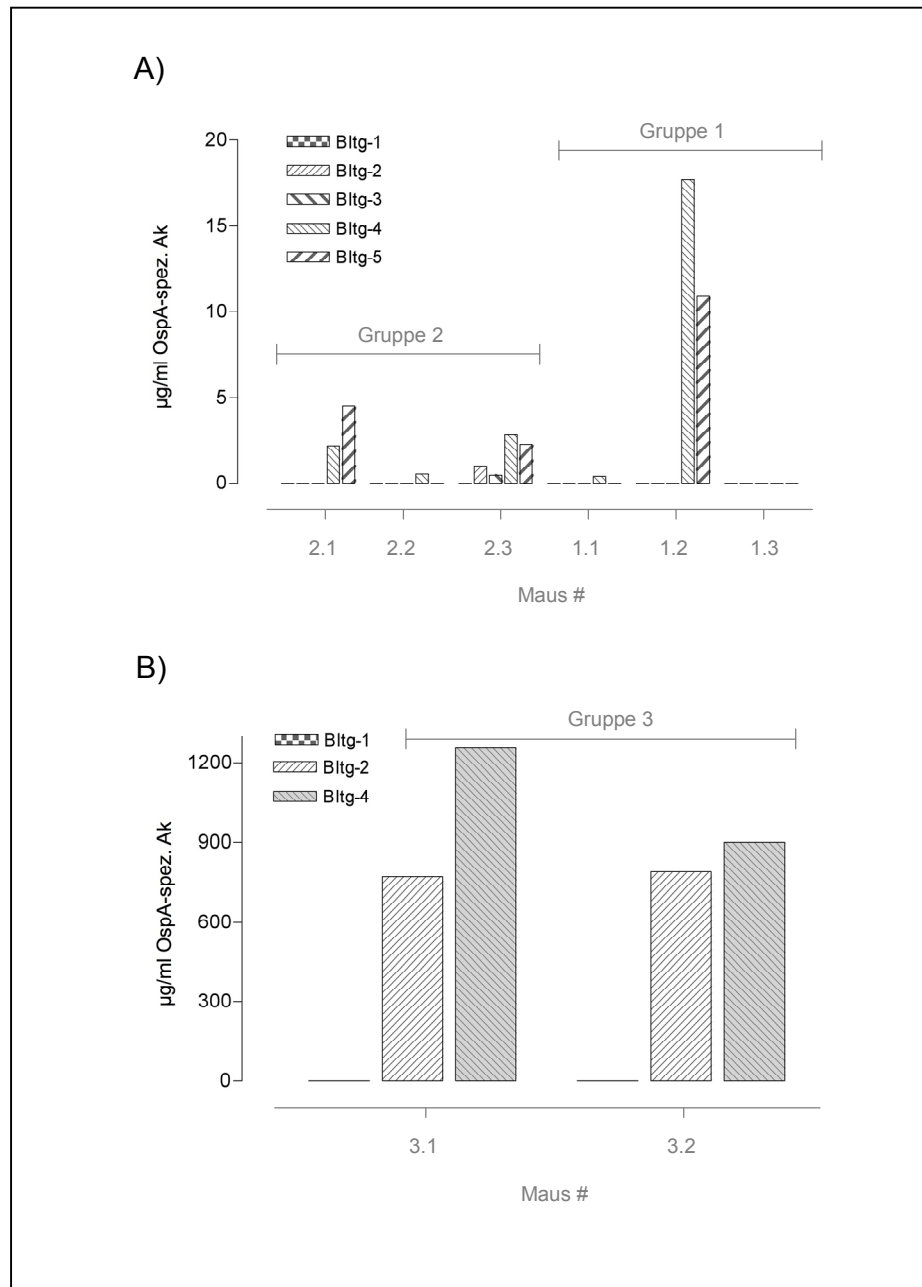


**Abbildung 3.33. Gefriergetrocknetes OspA-Material.** Zur Veranschaulichung der oral applizierten Menge von 5 mg gefriergetrocknetem Material an die Versuchstiere ist die Menge von 1 mg TG im Vergleich zu einer 1-Eurocent-Münze dargestellt.

**Tabelle 3.10. Schema zur oralen Immunisierung.** Aufgelistet sind die drei verschiedenen Versuchstiergruppen, die für die immunologische Studie zur Verfügung standen sowie die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe, Form des verabreichten Antigens und Art der Applikation.

Gruppe	Anzahl der Versuchstiere	Verabreichtes Antigen	Applikation
1	3	Tabak gefriergetrocknet entsprechend 5 µg OspA	oral
2	3	5 µg gereinigtes rekombinantes OspA aus <i>E. coli</i>	oral
3	2	5 µg gereinigtes rekombinantes OspA aus <i>E. coli</i>	subkutan

Für die orale Immunisierung mit gereinigtem OspA aus *E. coli* und transgenem Pflanzenmaterial konnte die Bildung reaktiver Antikörper an den Tagen 99 und 130 nachgewiesen werden (Abb. 3.34 A; Maus #2 der Gruppe 1 und Maus #1 und #3 der Gruppe 2). Die Antikörpertiter lagen bei einer Konzentration von 2-5 µg/ml für gereinigtes OspA und bei 12-18 µg/ml für transgenes Blattmaterial (Abb. 3.34 A). Im Vergleich zur subkutanen Applikation einer gereinigten Form von OspA, bei der bereits an Tag 36 ein Anti-OspA-Antikörpertiter von 800 µg/ml gemessen werden konnte (Abb. 3.34 B), war der resultierende Antikörpertiter nach oraler Immunisierung um den Faktor 40 bis 100 reduziert. Im Gegensatz zur subkutanen Verabreichung war zudem eine häufigere Applikation des Antigens zur Induktion der Antikörperbildung notwendig. Wie sich jedoch zeigte, resultierte eine orale Immunisierung der Versuchstiere sowohl mit gereinigtem OspA als auch mit transgenem Blattmaterial der Linie OA12 in der Bildung reaktiver Antikörper. Im Vergleich zur oralen Applikation der gereinigten Form führte die Verabreichung des Blattmaterials zwar nur bei einem der drei Versuchstiere zu einer Immunantwort, der gemessene Antikörpertiter war hier jedoch 2-4 mal höher als nach Verabreichung des gereinigten Proteins.



**Abbildung 3.34. Graphische Darstellung der Antikörperinduktion.** Dargestellt ist die Konzentration gemessener reaktiver anti-OspA-Antikörper im Blut immunisierter Mäuse. A) Ak-Titer nach oraler Applikation einer gereinigten Form von bakteriellem OspA aus *E. coli* (Gruppe 2) und nach oraler Applikation von transgenem OspA-Pflanzenmaterial (Gruppe 1). Bltg: Blutung. Bltg 1 nach 22 Tagen, Bltg 2 nach 36 Tagen, Bltg 3 nach 77 Tagen, Bltg 4 nach 99 Tagen, Bltg 5 nach 130 Tagen. B) Konzentration von anti-OspA-Antikörpern nach subkutaner Immunisierung mit gereinigtem bakteriellem OspA aus *E. coli*. Bltg: Blutung. Bltg 1 nach 22 Tagen, Bltg 2 nach 36 Tagen, Bltg 4 nach 99 Tagen.

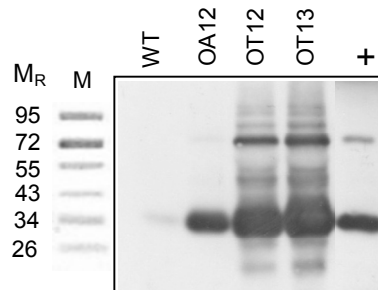
Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass transgenes Blattmaterial der OA12-Pflanzen ein eindeutiges Potential zur oralen Immunisierung besitzt und die Bildung reaktiver Antikörper induziert.

Für weiterführende Versuche sollte das immunogene Potential der neu generierten OspA-Linien getestet werden. Diese Pflanzen zeichneten sich im Vergleich zu Pflanzen der Linie OA12 durch eine um das 10- bis 20-fach gesteigerte Proteinakkumulation aus, so dass die zur Immunisierung verabreichte Menge an transgenem Blattmaterial reduziert werden konnte. Da Pflanzen der Linie OA13 und OA14 aufgrund des beeinträchtigten Wachstums nicht zur Pfropfung verwendet werden konnten, wurden für die folgende immunologische Studie Pflanzen der Linie OT12 herangezogen, die sich durch die Akkumulation einer nicht lipidierten Variante von OspA auszeichneten. Als Kontrolle diente Material von OA12-Pflanzen, für das die Induktion einer Immunantwort nach oraler Applikation, wie oben beschrieben, gezeigt werden konnte. Als Negativkontrolle wurde Blattmaterial gepfropfter WT-Pflanzen verwendet.

Die anschließenden Fütterungsversuche wurden von Professor Sam Telford am Tufts-New England Medical Center in Boston (USA) an Mäusen der Gattung *Peromyscus leucopus* durchgeführt. Die Weißfußmaus *P. leucopus* ist eine in Nord- und Mittelamerika lebende Mäuseart, die dort das natürliche Hauptreservoir für *B. burgdorferi* darstellt (Nadelman & Wormser, 1998).

Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial wurde zunächst mit Zuckerwasser und Erdnussbutter vermengt den Mäusen als Futter angeboten. Da die selbständige Aufnahme des Materials durch die Tiere unzureichend war, musste eine Verabreichung mittels Schlundsonde erfolgen. Aufgrund der zähen Konsistenz des gequollenen Pflanzenmaterials war dies für *P. leucopus* im Unterschied zu den BALB/c-Mäusen jedoch nicht möglich. Zur besseren Verabreichung des Materials an die Versuchstiere wurde daher ein wässriger Extrakt des gefriergetrockneten Materials erstellt. Dafür wurde 1.2 g [TG] Material von je drei gepfropften Pflanzen OA12, OT12 und WT in 40 ml Extraktionspuffer extrahiert. Zur Solubilisierung membranständiger Proteine enthielt der Puffer 0.01% Tween 20. Die Extrakte wurden mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von OspA untersucht (Abb.3.35) und schließlich gefriergetrocknet.





**Abbildung 3.35. Immunoblot zur Detektion von rekombinantem OspA in Extrakten des gefriergetrockneten Materials gepfropfter Tabakpflanzen.** Aufgetragen wurden 10 µl des erstellten Extraktes von gepfropften Pflanzen WT, OA12, OT12 und OT13. M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ ; +: 1 µg gereinigtes rekombinantes OspA aus *E. coli*.

Die Berechnung des Gehalts an rekombinantem OspA und Nikotin der gefriergetrockneten Extrakte (Trockenextrakte TE) erfolgte unter der Berücksichtigung folgender Fakten: \*) 100 mg FG Blattmaterial einer gepfropften OA12-Pflanze enthält 10 µg OspA (entspricht 1% des LGP); 100 mg FG Blattmaterial einer OT-Pflanze enthält mindestens 100 µg OspA (entspricht mindestens 10% des LGP). \*\*) Eine gepfropfte Pflanze enthält Nikotin in einer durchschnittlichen Konzentration von 78 µg/g TG. Die Reduktion des Frischgewichts bei Gefriertrocknung wurde mit dem Faktor 1:10 berücksichtigt. Damit enthielt 1 mg des gefriergetrockneten Extrakts der OT12-Pflanzen durchschnittlich 22.5 µg OspA; 1 mg des getrockneten Extrakts der OA12-Pflanzen enthielt durchschnittlich 1.8 µg OspA (Tab. 3.11). Für die Verabreichung von 5 µg des rekombinanten Proteins einer OA12-Pflanze mussten daher 2.7 mg des Extrakts verfüttert werden. Der Nikotingehalt dieser Menge Extrakt beträgt durchschnittlich 389 ng und liegt damit unter dem für Mäuse ermittelten LD50-Wert von 60 µg pro Tier. Für die immunologischen Untersuchungen standen drei Gruppen von Versuchstieren zur Verfügung: Dies waren die Gruppen WT, OA12 und OT12 mit jeweils drei Tieren pro Versuchsgruppe, die mit Extrakten von gepfropften WT-, OA12- beziehungsweise OT12-Pflanzen immunisiert wurden. Die orale Applikation der Extrakte entsprechend der Menge von 5 µg OspA pro Versuchstier erfolgte mit einer Schlundsonde an den Tagen 0, 10 und 20. Die Kontrollgruppe (WT) erhielt eine vergleichbare Menge an getrocknetem Extrakt der gepfropften WT-Pflanzen. An Tag 28 wurden Blutproben der Versuchstiere entnommen und mittels ELISA auf eine Akkumulation spezifischer anti-OspA-Antikörper untersucht.

**Tabelle 3.11. Gehalt an rpOspA und Nikotin in Trockenextrakten (TE) gepfropfter Pflanzen.** Die Trockenextrakte (TE) wurden von jeweils drei Pflanzen der Linien OA12, OT12 und WT erstellt (siehe Text). Ausgehend von der Menge des verwendeten Materials (1.2 g TG) erfolgte die Berechnung des Gehalts an rpOspA und Nikotin wie im Text erläutert. TE: Trockenextrakt; TG: Trockengewicht; \*: siehe Text; \*\*: siehe Text.

Probe	TE [mg]	OspA [µg] / 1 mg TE *	Nikotin [ng] / 1 mg TE **
WT #1	727.7		128.6
WT #2	646.3		144.8
WT #3	712		131.5
OT12 #1	573	28.9	163.4
OT12 #2	620.4	19.3	150.9
OT12 # 3	621.6	19.3	150.6
OspA # 1	682.7	1.8	137.1
OspA # 2	547.4	2.2	171.0
OspA # 3	751.5	1.6	124.6

Für alle Versuchstiere der beiden Gruppen OA12 und OT12 konnte eine Induktion der Antikörperproduktion im ELISA detektiert werden. Für die Tiere der Kontrollgruppe konnte keine entsprechende Immunantwort festgestellt werden. Eine weitere Untersuchung der Antikörperakkumulation erfolgte drei Monate nach der letzten Immunisierung. Eines von drei Versuchstieren der Gruppen OA12 und OT12 konnte damit positiv auf einen erhöhten Antikörpertiter getestet werden.

Ogleich die vorliegenden Daten zur oralen Immunisierung von *P. leucopus* mit transgenem OspA-Pflanzenmaterial noch rudimentär sind und weitere Untersuchungen in diesem Bereich folgen müssen, konnte das immunogene Potential von transgenem OspA-Pflanzenmaterial nach oraler Applikation bewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei oraler Verabreichung eines Pflanzenextrakts das immunogene Potential einer lipidierten (OA12) und einer nicht-lipidierten (OT12) Form von OspA vergleichbar sind.

## 4. Diskussion

Seit im Jahre 1982 mit humanem Insulin der erste rekombinante Arzneistoff eingeführt wurde, haben therapeutische Proteine aus genetisch veränderten Organismen stark an Bedeutung gewonnen. Allein auf dem deutschen Markt sind mittlerweile 140 verschiedene Arzneimittel zugelassen, deren Wirkstoffe rekombinant hergestellt werden (Dingermann & Zündorf, 2010). Produktionsplattformen dieser Therapeutika sind vor allem tierische oder prokaryotische Zellen und Hefezellen. Die Nutzung von Pflanzen als Bioreaktoren zur Herstellung rekombinanter Proteine stellt jedoch eine kostengünstige Alternative zu den bisherigen Produktionssystemen dar. Für das lipidierte Outer surface protein A (OspA) von *Borrelia burgdorferi*, einem Vakzin gegen Borreliose, wurde die erfolgreiche Synthese einer rekombinanten Form in Tabak-Chloroplasten beschrieben (Glenz et al., 2006). Bislang stellt OspA das einzige rekombinant in transplastomen Pflanzen synthetisierte Lipoprotein dar und bisher ist nur wenig über die Mechanismen der Lipidierung in pflanzlichen Zellen bekannt.

### 4.1 Untersuchungen zur Lipidmodifikation in transplastomen Pflanzen

Im Sinne einer wirtschaftlichen Nutzung von Pflanzen als Produktionsplattform rekombinanter Arzneistoffe ist eine möglichst hohe Akkumulationsrate des rekombinanten Proteins notwendig. Daher sollte durch einen alternativen Integrationsort der Expressionskassette in das Chloroplastengenom eine Erhöhung der bislang moderaten Proteinakkumulationsrate (1% des LGP) für rpOspA erzielt werden. Zusätzlich sollte durch Variationen der N-terminalen Signalsequenz eine Optimierung der Proteinlipidierung ermöglicht werden.

#### 4.1.1 Lipidierung und Lokalisation von plastidärem OspA

Zur Untersuchung der Lipidierung der verschiedenen OspA-Konstrukte und der im Chloroplasten zugrunde liegenden Lipidierungsmechanismen wurden isolierte Protoplasten einer Isotopenmarkierung mit Tritium-markierter Palmitinsäure unterzogen. Als Positivkontrolle dienten Protoplasten der Linie OA12, für die eine Inkorporation von Palmitinsäure bereits nachgewiesen worden war (Glenz et al., 2006). In Abhängigkeit der unterschiedlichen Signalsequenzen der OspA-Konstrukte konnte im Versuch die

Inkorporation radioaktiv-markierter Palmitinsäure für Variante OA13 mit Volllänge-Signalsequenz nachgewiesen werden (Tab. 4.1). Die aufgrund des Vorliegens der Volllänge-Signalsequenz erwartete Lipidierung für Variante OA13 konnte somit im Versuch bestätigt werden. Für die beiden Proteine mit verkürzter Signalsequenz OT12 und OT13 sowie für Variante OA14 mit substituiertem Cystein innerhalb der Volllänge-Signalsequenz konnte jedoch keine Inkorporation von Palmitinsäure detektiert werden (Tab. 4.1). Aufgrund der fehlenden Lipidierung für die Varianten OT12 und OT13 kann zunächst eine spontane Palmitoylierung der SH-Gruppe des konservierten Cysteins aufgrund eines nicht-enzymatischen Wegs, wie er für Mitochondrien beschrieben ist (Corvi et al., 2001), mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Da auch für das eukaryotische Lipidierungsmotiv der Variante OT12 keine Lipidierung nach plastidärer Expression nachgewiesen werden konnte, scheiden rein eukaryotische Vorgänge, die einer Palmitoylierung von Proteinen im Chloroplasten zugrunde liegen könnten, ebenfalls aus.

**Tabelle 4.1. Lipidmodifikation von rpOspA.** Dargestellt sind die zur Chloroplastentransformation verwendeten OspA-Konstrukte sowie die jeweils vorliegende N-terminale Signalsequenz. Das konservierte Cystein an Position +1 innerhalb der Signalsequenz ist fett hervorgehoben, das für Variante OA14 vorliegende Glycin an Position +1 ist rot dargestellt. Als Positivkontrolle dienten Protoplasten der Linie OA12. +: Detektion einer Lipidierung mittels *in vivo*-Isotopenmarkierung; -: Keine Detektion einer Lipidierung mittels *in vivo*-Isotopenmarkierung.

Konstrukt	N-terminale Signalsequenz	Lipidmodifikation
OA12	MEKYLLGIGLILALIACK...	+
OA13	MEKYLLGIGLILALIACK...	+
OA14	MAKYLLGIGLILALIA <b>CK</b> ...	-
OT12	MGCK...	-
OT13	MACK...	-

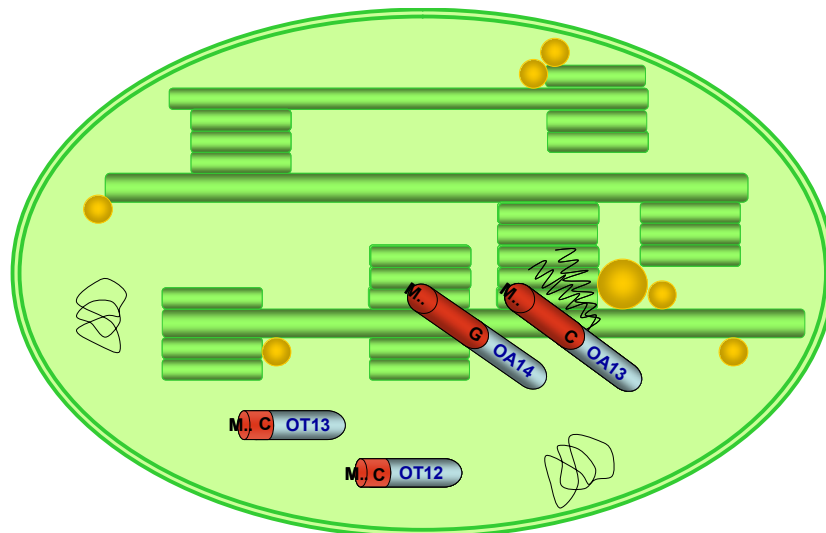
Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass autokatalytische Mechanismen sowie rein eukaryotische Vorgänge der Protein-Palmitylierung in Plastiden nicht zugrunde liegen. Außerdem konnte anhand der Varianten OT12 und OT13 gezeigt werden, dass die Präsenz einer N-terminalen Signalsequenz mit einer Mindestlänge an Aminosäuren für das Einsetzen des Lipidierungsmechanismus erforderlich ist.

Im Allgemeinen ist über Palmitylierungen in pflanzlichen Zellen bislang wenig bekannt. Man weiß, dass die Anheftung der Fettsäure an das Protein über eine Thioester-Verbindung an einem Cystein stattfinden kann (Martin & Busconi, 2000). Anhand von Konstrukt OA14 konnte eindeutig dargelegt werden, dass die Anheftung der Palmitinsäure zwingend an einem Cystein-Rest innerhalb der Signalsequenz erfolgen muss: Trotz Anwesenheit einer N-terminalen Volllängesequenz konnte für OA14 in Abwesenheit des Cysteins an Position +1 innerhalb der Signalsequenz keine Inkorporation von Palmitinsäure detektiert werden. Wie auch für die Lipidierung in prokaryotischen Zellen bekannt ist, nimmt damit das Cystein an Position +1 die Rolle einer zur Lipidmodifikation essentiellen Aminosäure ein.

In prokaryotischen Zellen resultiert aufgrund der N-terminalen Signalsequenz von OspA eine sogenannte Pam<sub>3</sub>Cys-Modifikation, die auf der Aktivität von den drei aufeinanderfolgenden Enzymen Lgt, Lsp und Lnt beruht. Genauere Untersuchungen der Lipidstruktur von rpOspA der Linie OA12 mittels MALDI-TOF-MS-Analyse zeigten jedoch, dass OspA in den Plastiden nicht prozessiert wird. Nach der Anheftung des Dipalmitylglycerolrests unterbleiben die Abspaltung der Signalsequenz und die Anheftung einer dritten Fettsäure. Die resultierende Modifikation der Volllängesequenz von OA12 und OA13 entspricht daher eher einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur, wie sie für Gram-positive Bakterien beschrieben ist (Hutchings et al., 2008). Bekannterweise verfügen Plastiden jedoch über keine Lgt-, Lsp- und Lnt-homologen Enzyme, weshalb sich über die vorliegenden Lipidierungsmechanismen zunächst keine weiteren Aussagen treffen lassen.

Da zunächst ein rein prokaryotischer oder eukaryotischer Lipidierungsmechanismus für Chloroplasten höherer Pflanzen ausgeschlossen werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt die Lokalisation des rekombinanten Proteins innerhalb der Organellen untersucht werden. Da lipidmodifizierende Enzyme membranständige Proteine darstellen, ist ein hydrophober Charakter des zu modifizierenden Proteins für eine Lipidmodifikation begünstigend; auf der anderen Seite bedingt die Anheftung von Fettsäureresten wiederum die Affinität des Proteins zu hydrophoben Kompartimenten (Quesnel et al., 1994). Bislang ist man davon ausgegangen, dass die Lokalisation von rpOspA innerhalb der Chloroplasten in Abhängigkeit des anwesenden Lipidrests an den Membranstrukturen erfolgt (Glenz, 2005;

Hennig, 2006). So konnte die lipidierte Volllängevariante OA12 an den Membranen des Thylakoidsystems nachgewiesen werden, während die nicht lipidierte Variante OT11 im Stroma akkumulierte. Eine Isolierung der Thylakoidmembranen der neu generierten OspA-Konstrukte entsprach zunächst dieser Theorie: Die Volllängesequenz der Variante OA13 führte zur Lipidierung und der Akkumulation des Proteins an den Thylakoiden, während die beiden verkürzten Sequenzen von OT12 und OT13 nicht in einer Lipidmodifikation resultierten und die entsprechenden Proteine nicht an den Membranen des Thylakoidsystems nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.1). Für Konstrukt OA14, das nachweislich in einem nicht-lipidierten Zustand im Chloroplasten vorlag, konnte allerdings eine eindeutige Assoziation zu den Membranen des Thylakoidsystems nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Lokalisation von OspA an den Thylakoiden weniger auf die Präsenz eines Lipidankers zurückzuführen ist, als vielmehr auf dem Vorhandensein der N-terminalen Signalsequenz basiert.



**Abbildung 4.1. Lokalisation von rpOspA im Chloroplasten.** Schematische Abbildung eines Chloroplasten mit Thylakoidsystem (grüne Balken), plastidärer DNA (in schwarz), Plastoglobuli (gelbe Kreise) und den rekombinanten Proteinen OA13, OA14, OT12 und OT13 sowie deren Lokalisation im Stroma (OT12 und OT13) oder an den Membranen des Thylakoidsystems (OA13 und OA14). Dargestellt sind der Proteinkörper in Blau sowie die Signalsequenzen (in Rot; mit Startmethionin und konserviertem Cystein bzw. Glycin für Variante OA14). Schematisch ist für Variante OA13 ein Dipalmitylrest angefügt.

Als Erklärung hierfür können folgende Gründe genannt werden: 1) Die Anwesenheit hydrophober Bereiche im mittleren Teil der Signalsequenz führt zur Assoziation des Proteins an hydrophoben Strukturen. 2) Die Signalsequenz wird zunächst als Lipidierungssignal erkannt. Der Lipidierungsprozess verläuft aber unvollständig (im Falle von OA12 und OA13), beziehungsweise kann aufgrund des Fehlens der essentiellen Aminosäure Cystein innerhalb der Signalsequenz (im Falle von OA14) nicht einsetzen, so dass das Protein in der Lipidierungsmaschinerie des Membransystems verbleibt. Eine Möglichkeit, diese Hypothesen zu testen, könnte durch die Isolation von Plastoglobuli stattfinden, welche Lipoprotein-Strukturen innerhalb von Plastiden darstellen. Untersuchungen an isolierten Plastoglobuli weisen darauf hin, dass diese Kompartimente in erster Linie an der Lipidbiosynthese und der Lagerung von lipophilen Molekülen beteiligt sind (Austin II et al., 2006; Ytterberg et al., 2006). Bei einer möglichen Isolierung von Plastoglobuli von OA14-Pflanzen sollte das Protein im Falle einer gezielten Lokalisation an den Thylakoidmembranen aufgrund eines Lipidierungssignals mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Plastoglobuli-Fraktion detektiert werden können. Erfolgt die Assoziation von OA14 unspezifisch aufgrund der hydrophoben Natur der Signalsequenz, ist eine Akkumulation von OA14 an oder in den Plastoglobuli zu erwarten.

Nach den gewonnenen Erkenntnissen bezüglich des Lipidierungsstatus und der Ursache der Lokalisation von rpOspA an den Thylakoidmembranen sollte im nächsten Schritt die Proteinakkumulationsrate generierter Pflanzen untersucht werden.

#### 4.1.2 Eine erhöhte Proteinakkumulation von rpOspA nimmt Einfluss auf die Vitalität transplastomer Pflanzen

Wie sich bei der Charakterisierung der generierten homoplastischen Pflanzenlinien OA13, OA14, OT12 und OT13 herausstellte, konnte durch die Wahl des Transformationsvektors pRB95 im Gegensatz zu Vektor pNT2 (Glenz et al., 2006) eine Erhöhung der Akkumulationsrate erzielt werden. Die Akkumulation an rekombinantem Protein variierte trotz einheitlichen Promoters (*PpsbA*) zwischen den verschiedenen Konstrukten: Während die beiden löslichen Varianten OT12 und OT13 (Abb. 4.1) bis zu 25% des LGP akkumulierten, betrug der Anteil der beiden membranassoziierten Varianten OA13 und OA14 nur 10% des LGP. Dieser Unterschied in der Akkumulationsrate zwischen OspA mit Volllänge- und OspA

mit verkürzter Signalsequenz konnte bereits für die Formen OA12 und OT11 beobachtet werden, die zu 1% bzw. 10% des LGP akkumulierten (Glenz et al., 2006). Divergierende Akkumulationsraten zwischen Volllänge- und verkürzter Form unter der Kontrolle eines einheitlichen Promoters können mit der variablen Aminosäureabfolge strangabwärts des Startkodons begründet werden. Wie bereits nachgewiesen, führen Variationen der Nukleotidsequenz strangabwärts des initialen Methionins zur Beeinflussung der Translationsrate (Tregoning et al., 2003; Nishikubo et al., 2005). Die variierende Nukleotidabfolge der Varianten OA und OT könnte deshalb für die divergierenden Akkumulationsraten verantwortlich sein. Weitere OspA-Konstrukte mit Mutationen innerhalb der N-terminalen Signalsequenz könnten daher kloniert und auf ihren Einfluss bezüglich der Proteinakkumulation untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der Einfluss auf die Proteinakkumulationsrate zu nehmen scheint, ist die Lokalisation des rekombinanten Proteins innerhalb der Chloroplasten. Bereits bei der rekombinanten Synthese von OspA in *E. coli* konnte eine reduzierte Akkumulationsrate einer lipidierten Form, die an den Bakterienmembranen verankert war, nachgewiesen werden. Als Begründung für diese Tatsache wurde ein möglicher letaler Effekt für die Bakterien bei Lokalisation des Lipoproteins an der bakteriellen Membran diskutiert (Dunn et al., 1990; Erdile et al., 1993). Im Falle der transplastomen Pflanzen OA13 und OA14 führte eine gesteigerte Expression der OspA-Konstrukte in Verbindung mit der Lokalisation des Proteins an den Thylakoidmembranen nachweislich zu einer Inhibierung von PS II und damit zum Verlust des photoautotrophen Wachstums. Wie mittels PAM-Fluorometrie gezeigt werden konnte, stellte die Schädigung des Photosystems keinen lokalen Defekt dar, sondern verteilte sich systemisch über die gesamte Blattspreite. Als Folge der Inhibierung des Photosystems kam es zu einem Mangel an endogenen Zuckern. Die Tendenz einer mangelnden Versorgung mit endogenen Sacchariden für die Linien OA13 und OA14 konnte mittels Pulsed Amperometric Detection (PAD) dargelegt werden, obgleich die gemessenen Konzentrationen für verschiedene Pflanzen der gleichen Linie teilweise stark schwankten und eine große Standardabweichung verursachten. Diese Diskrepanz zwischen den gemessenen Zuckerkonzentrationen verschiedener Individuen kann dadurch begründet werden, dass die jeweilige Messung zu einem definierten Zeitpunkt lediglich eine Momentaufnahme des abnehmenden Zuckergehalts und keine endgültige Konzentration darstellt. Letztendlich führte die mangelnde Versorgung mit endogenen Sacchariden jedoch zum Absterben von OA13- und OA14-Pflanzen. Aufgrund dieser Tatsache können Unterschiede in der Akkumulationsrate zwischen Volllänge- und verkürzter OspA-Variante



auf die Lokalisation des Proteins an den Thylakoiden zurückgeführt werden. Als photosynthetisch aktive Membranen beherbergen die Thylakoide eine Vielzahl an Molekülen und komplexen Verbindungen, die funktionelle Bestandteile der Elektronentransportkette und der Antennenkomplexe darstellen (Hervas et al., 2003). Die Integration weiterer Moleküle an den Membranen kann deshalb zu einer „Überladung“ und einer damit verbundenen Störung der räumlichen Orientierung funktioneller Proteine zueinander führen. Der Transfer der Elektronen von PS II zum Cytochrom  $b_6$ -f-Komplex beispielsweise erfolgt über das lipophile Molekül Plastochinon, das freibeweglich in den Membranen der Thylakoide lokalisiert ist. Eine Inhibierung der Mobilität des Proteins durch Anreicherung von Fremdprotein an den Membranen kann daher zu einer Blockade des Elektronentransports und zu einer Inhibierung der Photosynthese führen. Da die Proteinsynthese unter dem Einfluss des verwendeten Promotors *PpsbA* ein Licht-regulierter Prozess ist (Staub & Maliga, 1994), kann man davon ausgehen, dass nach dem Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus und der Kultivierung unter Volllicht die Proteinsynthese weiter steigt, was schließlich zum raschen Kollabieren des Photosystems führt. Es ist deshalb naheliegend, dass die für OA13- und OA14-Pflanzen unter Zellkulturbedingungen detektierte Proteinakkumulationsrate von 10% des LGP nicht die maximal mögliche Akkumulationsrate darstellt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass in Zusammenhang mit den veränderten Lichtverhältnissen nach dem Transfer ins Gewächshaus eine erhöhte Proteinakkumulation von > 10% des LGP einsetzt, die letztendlich für die Schädigung des PS II und den daraus resultierenden Mangel an Saccharose verantwortlich ist. Aufgrund der raschen Degradation der Pflanzen nach dem Umsetzen war eine Bestimmung des finalen Proteingehalts jedoch nicht mehr möglich. In Einklang mit der genannten Theorie steht auch die Tatsache, dass für OA13- und OA14-Pflanzen, die nach dem Umsetzen unter Starklichtbedingungen kultiviert wurden und somit eine größere Transkriptionsrate aufweisen sollten, eine raschere Progression der Schädigung von PS II mittels PAM-Fluorometrie nachgewiesen werden konnte als für Pflanzen, die unter Schwachlichtbedingungen kultiviert wurden. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die Akkumulation von OspA an den Membranen des Thylakoidsystems einer Grenze unterliegt und Raten von mehr als 10% des LGP toxische Effekte auf die Vitalität der Pflanzen haben. Als Beleg dafür können OA:YFP-Pflanzen genannt werden, die eine lipidierte Form von OspA in Fusion mit YFP zu 10% des LGP akkumulierten. Obwohl das lipidierte Fusionsprotein nachweislich in Assoziation zu den Thylakoidmembranen vorlag, waren OA:YFP-Pflanzen zu einem zwar bezüglich der Blattentwicklung und Samenbildung eingeschränkten, aber dennoch autotrophen Wachstum im Gewächshaus befähigt. Weshalb

die Akkumulationsrate von OA:YFP-Pflanzen auf 10% des LGP beschränkt und damit geringer als bei der Expression von *ospa* alleine war, kann möglicherweise durch die zusätzliche Fusion des Proteins an YFP erklärt werden, für das eine reduzierte Akkumulation nach plastidärer Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 4.1.4).

Neben der Theorie der sterischen Inhibierung der Photosyntheseaktivität durch einen Überschuss an Fremdprotein an den photosynthetisch-aktiven Membranen könnten die mittels PAM-Fluorometrie detektierten Defekte der OA13- und OA14-Pflanzen auch durch eine Depletion von Proteinen, die maßgeblich an photosynthetischen Prozessen beteiligt sind, verursacht werden. Zur Untersuchung des Einflusses der gesteigerten *OspA*-Synthese auf die Transkription und Translation endogener Gene und Proteine wurde deshalb eine 2D-Gelelektrophorese des Proteoms von WT-, OA12- und OA13-Pflanzen durchgeführt. Dabei konnten im Allgemeinen Proteine als differentiell identifiziert werden, die Funktionen im Metabolismus haben (Malatdehydrogenase, Cystein-Synthase, Glucan-Endoglucosidase) oder in Bezug mit lipophilen Kompartimenten der Chloroplasten stehen (Plastidenlipidassoziiertes Protein, plastidäres ribosomlaes Protein, DREPP2). Dabei stellte sich heraus, dass eine differentielle Akkumulation von essentiellen photochemisch-aktiven Proteinen nicht vorlag. Mit diesem Ergebnis konnte die These der Inhibierung von PS II aufgrund einer sterischen Inhibierung durch eine erhöhte Akkumulation von Fremdprotein an den photosynthetisch-aktiven Membranen bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte mit den neuen *OspA*-Varianten die Proteinakkumulationsrate transplastomer Pflanzen von 1% LGP auf 10% LGP im Falle von Volllängesequenzen (OA13 und OA14) und von 10% LGP auf 25% LGP im Falle von *OspA*-Varianten mit verkürzter Signalsequenz (OT12 und OT13) gesteigert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Chloroplasten zur posttranslationalen Lipidmodifikation aufgrund bakterieller Sequenzmotive fähig sind und die Lokalisation der Proteine in Abhängigkeit des Vorhandenseins der Volllängesignalsequenz an den Membranen des Thylakoidsystems erfolgt. Vergleicht man die erzielten Akkumulationsraten mit denen von löslichen Proteinen wie Phagen-Lysin oder p24, die bis zu 40% oder 70% des LGP in transplastomem Tabak akkumulierten (Oey et al., 2009; Zhou et al., 2008), sind die mit *OspA*-Pflanzen erzielten Raten von 10% des LGP eher mäßig. Im Hinblick auf die mit der erhöhten Akkumulation verbundenen letalen Folgen für die Pflanze ist eine Produktion von *rpOspA* mit Volllängesignalsequenz von mehr als 10% des LGP in transplastomen Pflanzen nicht effektiv. Höhere Expressionsraten von 25% LGP können im Falle von *OspA* nur durch Entfernen oder Minimierung der bakteriellen

Signalsequenz erzielt werden. Inwieweit diese Resultate auch auf andere bakterielle Lipoproteine übertragbar sind, kann durch Expression alternativer Lipoproteine in transplastomen Pflanzen untersucht werden. Für das lipidierte Outer membrane protein 19 (Omp19) von *Brucella abortus* erfolgte bereits die Expression in transplastomen Tabakpflanzen. Auch für dieses Protein scheint die Akkumulation in Abhängigkeit der bakteriellen Signalsequenz begrenzt zu sein (Borkowski, 2007). Die Nutzung pflanzlicher Bioreaktoren zur Produktion bakterieller Lipoproteine in großem Maßstab bleibt damit zunächst eine Herausforderung. Für Proteine wie das Oberflächenprotein Omp19 von *Brucella abortus*, dessen immunogenes Potential nicht von der Anwesenheit des Lipidrestes abhängig gemacht wird (Pasquevich et al., 2010), können transplastome Pflanzen jedoch effektiv als Produktionsplattform von nicht-lipidierten Varianten genutzt werden.

### 4.1.3 Ermittlung eines minimalen Lipidierungsmotivs mithilfe des Reportergeren-Systems

Wie gezeigt werden konnte, stellt die Anwesenheit der bakteriellen Volllängesignalsequenz einen limitierenden Faktor für eine effektive Produktion von rpOspA dar. Da der Lipidrest aber entscheidenden Einfluss auf die Immunogenität des Proteins zu nehmen scheint (Erdile et al., 1993), sollte ein zur Lipidierung minimales Sequenzmotiv gefunden werden, mit dem eine Lipidierung ohne Assoziation des Proteins an den photosynthetisch-aktiven Membranen möglich sein könnte. Zu diesem Zweck standen transplastome YFP-Pflanzen zur Verfügung, die *yfp* in Fusion mit unterschiedlich langen Varianten der bakteriellen Signalsequenz von OspA (Reportergeren-Konstrukte) exprimieren sollten. Erste Pflänzchen der Reportergeren-Konstrukte wurden dazu einer *in vivo*-Isotopenmarkierung unterzogen. Die Inkorporation der Palmitinsäure konnte im Versuch für Konstrukt YFP11 und YFP12 nachgewiesen werden, während für Konstrukt YFP13 keine Lipidierung detektiert werden konnte. Die Ergebnisse der Konstrukte YFP11 und YFP13 entsprachen dabei den Resultaten, die mit den transplastomen OspA-Pflanzen OA13 und OT13 mit vergleichbaren Signalsequenzen erzielt wurden. Im Falle von YFP12 konnte gezeigt werden, dass die Volllängesignalsequenz zur Lipidierung nicht essentiell ist, sondern die Anwesenheit der Lipobox ALIACK für eine Palmitoylierung des Proteins ausreichend ist. Eine weitere Verkürzung der Lipobox-Sequenz resultierte in keiner Lipidierung, wie mit Konstrukt YFP13 belegt werden konnte. Damit konnte die für eine Lipidierung nach transplastomer Expression minimal notwendige Signalsequenz identifiziert werden. Es wäre nun von großem Interesse

gewesen, die Eigenschaften der Lipidierung von Variante YFP12 sowie deren Einfluss auf die Lokalisation des Proteins innerhalb der Plastiden zu untersuchen. Eine verminderte Assoziation zu den Membranen des Thylakoidsystems aufgrund der verkürzten Signalsequenz und eine damit verbundene Reduktion des inhibitorischen Effekts auf PS II wären denkbar. Weitere Untersuchungen konnten aufgrund einer mangelnden Stabilität von YFP nicht durchgeführt werden (Kap. 4.1.4). Zukünftig sollten daher zur Untersuchung des Lipidierungspotentials der verkürzten Signalsequenz MALIACK die Klonierung einer entsprechenden OspA-Variante und die Generierung transplastomer Pflanzen erfolgen. Aufgrund des Lipidierungspotentials der Signalsequenz MALIACK in Verbindung mit einer potentiell verminderten Assoziation zu den Thylakoidmembranen ist die Synthese einer lipidierten und damit immunogenen Form von OspA ohne letalen Effekt für die generierten Pflanzen denkbar.

### 4.1.4 Bakterielle Signalsequenzen haben negativen Einfluss auf die Akkumulationsrate rekombinanter plastidärer Proteine

Für die transplastomen Pflanzen OA13, OA14, OT12 und OT13 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine gesteigerte Akkumulation an rekombinantem Protein in Abhängigkeit des alternativen Chloroplastenexpressionsvektors pRB95 von 10% bis 20% des LGP möglich ist. Im Gegensatz dazu konnte für die Reporter-gen-Konstrukte YFP11, YFP12 und YFP13 unter Verwendung desselben Chloroplastenexpressionsvektors keine gesteigerte Proteinakkumulation bewirkt werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass das Reporterprotein in der Pflanze nicht stabil war. Eine mangelnde Proteinsynthese aufgrund einer Inhibierung der Transkription konnte jedoch ausgeschlossen werden (Borkowski, 2007). Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Fusion von *yfp* an *ospa* mit Vollängesignalsequenz in einer stabilen Akkumulation des Fusionsproteins resultierte. Es stellte sich daher die Frage, aus welchem Grund OspA oder die Fusion OA:YFP in einer stabilen Proteinakkumulation resultierte, während YFP in Anwesenheit der bakteriellen Signalsequenz nicht stabil war. Als mögliche Gründe für die mangelnde Proteinakkumulation können genannt werden: 1) Inhibierung der Translation des spezifischen Transkripts aufgrund der vorliegenden Signalsequenz oder 2) Degradation des gebildeten Proteins durch Proteasen. Da für OspA-Konstrukt OT13 eine identische Signalsequenz vorlag wie für Konstrukt YFP13, kann eine Inhibierung der Translation in Abhängigkeit der Signalsequenz ausgeschlossen werden. Ein Abbau des Proteins durch Proteasen kann demnach als Grund

für die mangelnde Proteinakkumulation von YFP in Betracht gezogen werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte auch für das bakterielle Lipoprotein Omp19 in transplastomen Pflanzen eine mangelnde Proteinakkumulation detektiert werden, während das Transkript in jedem Altersstadium der Pflanze detektierbar war (Borkowski, 2007). Für das Rotavirus VP6 Protein konnten Birch-Machin *et al.* (2004) eine mangelnde Akkumulation in älteren Blättern transplastomer Tabak-Pflanzen nachweisen, während das Transkript durchgehend detektiert werden konnte. Auch hier wurde ein proteolytischer Abbau von VP6 in den Chloroplasten verantwortlich gemacht. Dass es in Abhängigkeit des Blattalters zu einer Degradation von rekombinantem Protein kommt und in den jüngeren Blättern ein höher Gehalt an rekombinantem Protein detektiert werden kann, konnte auch für rekombinantes Erythropoietin (EPO) gezeigt werden (Conley *et al.*, 2010). Im Unterschied zu VP6 und EPO konnte für YFP und Omp19 in Anwesenheit der bakteriellen Signalsequenz keine Abhängigkeit der Protein-Degradation vom Blattalter beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben äußeren Einflüssen wie Pflanzen- oder Blattalter auch die Anwesenheit bakterieller Signalsequenzen einen negativen Einfluss auf die Akkumulationsrate rekombinanter Proteine ausüben kann. Als Beweis für diese These sollten zukünftig transplastome Pflanzen generiert werden, die *yfp* oder *omp19* ohne N-terminale Signalsequenz exprimieren und damit die Proteinakkumulation in Abwesenheit einer bakteriellen Signalsequenz bestätigt werden.

Auf der anderen Seite konnte im Falle der OspA-Pflanzen in Anwesenheit der bakteriellen Signalsequenz keine Degradation des Proteins durch induzierte Proteasen beobachtet werden. Diese Tatsache kann durch den Protease-resistenten Charakter von OspA begründet werden: Wie Luke *et al.* bereits 1997 zeigen konnten, ist zum proteolytischen Verdau von OspA eine 256-fach höhere Trypsin-Konzentration nötig als zum Verdau des ebenfalls aus *B. burgdorferi* stammenden Proteins OspD. Eine Stabilisierung von plastidärem YFP durch den Protease-resistenten Charakter von OspA ist möglich und wurde in dieser Arbeit durch die Fusion von *ospa* und *yfp* anhand der transplastomen Pflanzen OA:YFP belegt. Obwohl YFP in Fusion an OspA stabilisiert werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die Proteinakkumulationsrate des Fusionsproteins durch die destabilisierenden Eigenschaften von YFP beschränkt wurde. Eine Akkumulationsrate von 10% des LGP wurde daher nicht überschritten und liegt damit unter der für OT-Pflanzen erzielten Rate von 20% des LGP. Dieser reduzierte Gehalt an Fremdprotein an den Thylakoiden scheint für die photosynthetischen Funktionen der Membranen jedoch tolerabel, so dass OA:YFP-Pflanzen zu einem beschränkten aber photoautotrophen Wachstum

befähigt waren.

In Übereinstimmung mit der Fusion von YFP an OspA konnte auch für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF) oder das Protein E7 des HP16-Virus eine Stabilisierung des rekombinanten Proteins durch eine Fusion an die N-terminale Aminosäuresequenz der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) beziehungsweise dem Kartoffel Virus X-Hüllprotein erzielt werden (Wirth et al., 2006; Morgenfeld et al., 2009). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Bildung von Disulfidbrücken oder Einschlusskörpern Faktoren sind, die bei der Stabilisierung rekombinanter Proteine gegenüber proteolytischer Degradation eine zentrale Rolle spielen (Wirth et al., 2006). Wie Apel *et al.* (2010) zeigen konnten, ist jedoch auch die Identität der Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Signalsequenz für die Stabilität rekombinanter Proteine in transplastomen Pflanzen von Bedeutung. Aus diesem Grund kann auch die Anwesenheit der bakteriellen Signalsequenz von OspA als Trigger für eine Degradation der Reporter-gen-Konstrukte angesehen werden. Dies kann entweder in Abhängigkeit der Identität der Aminosäuren der N-terminalen Sequenz erfolgen oder durch den bakteriellen Ursprung des N-terminalen Signalpeptids selbst begründet werden: Wie auch tierische Organismen sind Pflanzen in der Lage, konservierte bakterielle Strukturen (PAMPs) zu erkennen und einen Pathogenbefall durch gezielte Abwehrmechanismen zu verhindern. So fungiert das Peptid Flg22 Gram-negativer Bakterien in Arabidopsis und Tomate als Elicitor zur Auslösung einer Abwehrreaktion, die die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Induktion von Pr-Proteinen beinhaltet (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 1999). Für die Pflanzen OA13 und OA12 konnten mittels 2D-Gelelektrophorese keine signifikanten Spots, die auf eine verstärkte Expression endogener Proteasen schließen ließen, identifiziert werden. Allerdings konnte eine differentielle Expression der Glucan-Endoglucosidase detektiert werden, deren Expression als Antwort auf einen Pathogenbefall induziert wird (Shinshi et al., 1988). Man kann daher vermuten, dass die bakterielle Signalsequenz von OspA als PAMP innerhalb der Pflanzenzelle erkannt wird und die Degradation von YFP somit durch bereits im Stroma befindliche Proteasen erfolgt.

### 4.1.5 Untersuchung endogener Lipidierungssequenzen

Wie sich für OspA- sowie für YFP-Pflanzen herausstellte, übt die Anwesenheit prokaryotischer Lipidierungssequenzen rekombinanter Proteine einen negativen Einfluss auf die Vitalität transplastomer Pflanzen und die Proteinakkumulation in den Plastiden von *N. tabacum* aus. Von verschiedenen endogenen plastidären Proteinen weiß man, dass sie in einem lipidierten Zustand in der Pflanzenzelle vorliegen. Allgemein ist jedoch wenig über die Lipidierungsmechanismen in pflanzlichen Zellen und den Plastiden im Besonderen bekannt. Aus diesem Grund sollte der Einfluss endogener putativer Signalsequenzen der plastidären Proteine D1, CP43 und CP47 auf die Lipidmodifikation rekombinanter Proteine untersucht werden und damit die negativen Effekte bakterieller Signalsequenzen bei der Synthese rekombinanter Lipoproteine in transplastomen Pflanzen möglicherweise umgangen werden. Da ein Verlust der Vitalität generierter Pflanzen aufgrund einer erhöhten Lipoproteinsynthese wie bei OA13- und OA14-Pflanzen ausgeschlossen werden sollte, wurde als Chloroplastenexpressionsvektor pRB96 gewählt, in dem die Expressionskassette anstelle des *psbA*-Promoters unter der Kontrolle des Promoters *atpI* steht. Wie die Untersuchungen generierter homoplastischer Pflanzen zeigten, war die Proteinakkumulation bedingt durch eine reduzierte Transkriptionsrate unter der Kontrolle des vorliegenden Promoters minimal. Aufgrund der geringen Aktivität des Promoters *atpI* konnten deshalb keine Aussagen über eine Lipidmodifikation von OspA unter den vorliegenden putativen Signalsequenzen getroffen werden. Zur Untersuchung des Lipidierungsstatus der Lipobox-Konstrukte könnte die Expression in einem zweiten Ansatz unter der Verwendung des Chloroplastenexpressionsvektors pRB95 und dem Promoter *psbA* erfolgen. Auch im Falle eines PS II-inhibitorischen Effekts des synthetisierten Proteins sollte die Kultivierung der Pflanzen unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur möglich sein. Damit sollte die Untersuchung einer potentiellen Lipidierung in Abhängigkeit der plastidären Sequenzmotive ermöglicht werden. Da die Erzeugung homoplastischer Pflanzen ein sehr langwieriger Prozess ist, konnte dieser Nachweis im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr erfolgen. Um dennoch Rückschlüsse auf das Lipidierungspotential der gewählten endogenen Signalsequenzen ziehen zu können, erfolgte eine transiente Expression der Lipobox-Konstrukte.

## 4.2 Transiente Expression

Wie sich in der vorliegenden Arbeit herausstellte, war die erfolgreiche Expression der Lipobox-Konstrukte in transplastomen Pflanzen aufgrund einer geringen Promoteraktivität nicht möglich. Ebenso konnten die generierten YFP-Pflanzen wegen einer mangelnden Proteinakkumulation nur kurzfristig zur Untersuchung des Lipidierungsstatus verwendet werden. Die Detektion einer vorliegenden Lipidmodifikation anhand der visuellen Lokalisation des Proteins, wie sie für die Reporter-gen-Konstrukte ursprünglich geplant war, konnte daher nicht erfolgen. Da die Erzeugung neuer homoplastischer Pflanzenlinien einen sehr zeitaufwändigen Prozess darstellt, wurde als Alternative das transiente Expressionssystem der Firma ICON Genetics herangezogen. Unter Verwendung des 5'-Moduls 20030 mit Chloroplasten-Targeting-Sequenz sollte die Untersuchung des Lipidierungsstatus von Konstrukten erfolgen, für die eine erfolgreiche Proteinakkumulation nach stabiler Chloroplastentransformation nicht möglich war (Lipobox-Konstrukte Lip21 bis Lip23 und Reporter-gen-Konstrukte YFP21 bis YFP25). Unter Verwendung des 5'-Moduls 15879 sollte zudem ein direkter Vergleich der Prozessierung einheitlicher Signalsequenzen in den unterschiedlichen Zellkompartimenten Cytosol und Chloroplast nach transienter Expression erbracht werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Sequenzen der Lipobox- und YFP-Konstrukte zur transienten Expression verwendet und zur Unterscheidung des Expressions-Systems in Lip21 bis Lip23 beziehungsweise YFP21 bis YFP25 benannt (Tab. 4.2).

Zusätzlich sollte mittels transienter Expression auch die Lipidmodifikation einer OspA-Volllängesequenz und der Signalsequenzen der Konstrukte *oa14* und *yfp12*, für die der Nachweis des Lipidierungsstatus nach plastidärer Expression in dieser Arbeit bereits erbracht worden war, nach Expression im Zellkern untersucht werden. Dafür wurden die entsprechenden Signalsequenzen anhand der Konstrukte *oa25*, *oa24* und *ot25* untersucht (Tab. 4.2).



### 4.2.1 Einfluss N-terminaler Signalsequenzen auf die transiente Expression

Die genannten Konstrukte wurden zur Infiltration mit den beiden 5'-Modulen 15879 und 20030 herangezogen. Zwei bis fünf Tage nach dem Infiltrationsvorgang konnten für fast alle Konstrukte starke nekrotische Erscheinungen oder das Welken der Blätter beobachtet werden. Eine Ausnahme stellten dabei Pflanzen dar, die mit dem Lipobox-Konstrukt Lip21 infiltriert worden waren: Während diese Pflanzen keine Nekrosen oder nur minimale nekrotische Läsionen um die Infiltrationsstelle aufwiesen, konnte jedoch auch zu keinem Zeitpunkt eine Akkumulation an rekombinantem Protein nachgewiesen werden. Diese Tatsache ist ein Indikator dafür, dass nicht der Infiltrationsprozess an sich als vielmehr die Transgenexpression und Akkumulation des rekombinanten Proteins für die mangelnde Vitalität der Pflanzen nach der Infiltration verantwortlich gemacht werden können.

Im Allgemeinen zeigten Immunoblot-Untersuchungen der infiltrierten Pflanzen nach der Infiltration eine geringe Proteinakkumulationsrate. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an OA25 nach Infiltration in Kombination mit dem 5'-Modul 15879 ergab einen Gehalt von 0.15% des LGP, was deutlich unter den in der Literatur angegebenen Proteinkonzentrationen von bis zu 80% am LGP für die transiente Expression mit dem ICON-System liegt (Marillonnet et al., 2004; Marillonnet et al., 2005) und auch die Akkumulationsrate von 1%-10% nach stabiler Chloroplastentransformation deutlich unterschreitet. Wie sich jedoch herausstellte, traten die genannten geringen Akkumulationsraten vorrangig bei Konstrukten mit einer N-terminalen Vollängesignalsequenz auf (OA25, OA14, YFP21), während Konstrukte mit verkürzter Signalsequenz (OT25, YFP22 bis YFP25) in einer deutlich stärkeren Proteinakkumulation resultierten (Tab. 4.2), die anhand der Bandenintensität im Immunoblot nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund scheint es naheliegend, dass ein negativer Einfluss der bakteriellen Vollängesignalsequenz auf die Transgenexpression und Proteinakkumulation bei transienter Expression besteht. Für Suspensionskulturen kerntransformanter Tabakzellen, die eine Vollängesequenz von *ospa* exprimierten, konnte eine Sekretion des rekombinanten Proteins in das Medium nachgewiesen werden (Navarre et al., 2006). Synthetisiertes OspA konnte daher im Medium aber kaum in den Zellen an sich detektiert werden, während die Expression einer verkürzten Variante ohne Signalsequenz zu einer Akkumulation des Proteins innerhalb der transgenen Zellen führte. Diese Ergebnisse belegen, dass die bakterielle Signalsequenz von OspA im Cytosol als Exportsignal erkannt wird und die Sekretion in den Apoplasten bedingt (Navarre et al., 2006).

**Tabelle 4.2. Proteinakkumulation nach transienter Expression.** Dargestellt sind die zur transienten Expression verwendeten OspA-, Lipobox- und Reporterger-Konstrukte sowie die jeweils vorliegende N-terminale Signalsequenz und die mittels Immunoblot detektierte Proteinakkumulation im Blattextrakt unter Verwendung von 5'-Modul 15879. +: geringe Proteinakkumulation; ++ mäßige Proteinakkumulation; -: keine Proteinakkumulation. Cysteine innerhalb der Signalsequenz sind fett hervorgehoben.

Konstrukt	N-terminale Signalsequenz	Proteinakkumulation
OA25	MAKYLLGIGLILALIACK...	+
OA24	MAKYLLGIGLILALIAGK...	+
OT25	MALIACK...	++
Lip21	MVLHFLLG <b>V</b> ACY...	-
Lip22	MGIHLFLSGVAC <b>F</b> GRS...	+
Lip23	MVSVFGFIAC <b>C</b> FVRS...	++
YFP21	MAKYLLGIGLILALIACK...	-
YFP22	MALIACK...	++
YFP23	MACK...	++
YFP24	MGCK...	++
YFP25	M...	++

Aufgrund des Protease-resistenten Charakters von OspA ist ein proteolytischer Abbau des rekombinanten Proteins im extrazellulären Raum auszuschließen, so dass als Grund für die allgemein geringe Proteinakkumulation von OA24, OA25 und YFP21 eine geringe Expressionsrate der Transgene in Betracht gezogen werden muss. Diese These wird auch durch die Tatsache belegt, dass es für die genannten Volllänge-konstrukte nicht möglich war, unter Verwendung des Chloroplasten-Targeting-Moduls 20030 einen optimierenden Effekt

auf die Akkumulationsrate zu erzielen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen sind auch die Resultate der transienten Expression eines alternativen bakteriellen Lipoproteins: Für das bakterielle Lipoprotein Omp19 des Bakteriums *Brucella abortus* war eine Akkumulation des rekombinanten Proteins nach transienter Expression in *N. benthamiana* bisher nur für eine verkürzte Variante ohne N-terminale Signalsequenz möglich (Pasquevich et al., 2010). Es scheint daher wahrscheinlich, dass bakterielle Signalsequenzen inhibitorische Einflüsse bezüglich der Transgenexpression bei transienter Expression ausüben.

Obwohl für Konstrukt Lip21 eine pflanzliche Signalsequenz vorlag, konnte für dieses Konstrukt keine erfolgreiche transiente Expression durchgeführt werden. Man kann deshalb davon ausgehen, dass auch endogene Signalsequenzen bei der Expression in alternativen Zellkompartimenten zu nicht vorhersehbaren Effekten führen und negativen Einfluss auf Transkription, Translation oder Proteininstabilität ausüben können. Eine weitere Auffälligkeit bezüglich der Proteinakkumulationsrate konnte außerdem für die beiden verwendeten 5'-Module festgestellt werden. Hier war die Akkumulationsrate unter Verwendung des 5'-Moduls 20030 für Volllänge-OspA- und Lipobox-Konstrukte (OA24, OA25, Lip22 und Lip23) niedriger als in Kombination mit dem 5'-Modul 15879. Eine allgemein mangelnde Funktionalität des Moduls 20030 kann jedoch ausgeschlossen werden, da für Konstrukte mit verkürzter N-terminaler Signalsequenz (OT25, YFP22 und YFP25) keine derart verminderte Akkumulation im Vergleich zur Verwendung des 5'-Moduls 15879 festgestellt werden konnte. Eine Ausnahme bildete Konstrukt YFP23 mit verkürzter N-terminaler Sequenz, für das in Kombination mit 5'-Modul 15879 eine beachtliche Menge an Protein, in Kombination mit 5'-Modul 20030 jedoch kein Protein im Blattlysate nachgewiesen werden konnte. Mittels CLSM-Analyse isolierter Protoplasten der YFP23-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass rekombinantes YFP lediglich in einzelnen Chloroplasten weniger Zellen des infiltrierten Blattmaterials detektierbar war. Diese Mengen waren für einen immunologischen Nachweis jedoch zu gering. Da die Expression in Verbindung mit Modul 15879 in einer relativ starken Proteinakkumulation resultierte und für die übrigen Reporter-Gen-Konstrukte keine negativen Effekte in Verbindung mit dem Chloroplasten-Targeting-Modul beschrieben werden konnten, kann als einzige Ursache für diese außerordentlich geringe Proteinakkumulation von Konstrukt YFP23 ein individueller Effekt aufgrund der Kombination der beiden Signalpeptide in Erwägung gezogen werden.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der Effekt einer geringen Proteinakkumulation aufgrund des Vorliegens einer Volllängesignalsequenz in Verbindung mit einem Chloroplasten-Targeting-Modul verstärkt wird und zu starken Einbußen der Proteinakkumulation bei transienter Expression führt. Letztendlich war zu keinem Zeitpunkt die erfolgreiche Akkumulation eines Konstrukts mit bakterieller Volllängesequenz möglich, während die Akkumulation von Konstrukten mit verkürzter Signalsequenz unabhängig von der Anwesenheit eines Lipidrests stattfand. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen nach stabiler Chloroplastentransformation konnte mit den vorliegenden Ergebnissen der transienten Expression der signifikante Einfluss bakterieller Signalsequenzen auf die Expression und Akkumulationsrate rekombinanter Proteine in pflanzlichen Produktionssystemen bestätigt werden.

### 4.2.2 Untersuchung zur Lipidierung nach transienter Expression

Untersuchungen zum Lipidierungsstatus der OspA- und Lipobox-Konstrukte mittels *in vivo*-Inkorporation Tritium-markierter Palmitinsäure scheiterten aufgrund einer zu geringen Proteinakkumulation und des stark nekrotischen Blattmaterials infiltrierter Pflanzen, das eine erfolgreiche Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten verhinderte. Letztendlich war eine Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten nach transienter Expression nur für die Reporterger-Konstrukte gegeben. Ursprüngliches Ziel des Reporterger-Systems war die visuelle Detektion des rekombinanten Proteins innerhalb der Zelle in Abhängigkeit eines möglichen Lipidrests, wie es bereits zur Untersuchung des Lipidierungsstatus heterotrimerer G-Proteine erfolgreich angewandt wurde (Adjobo-Hermans et al., 2006). Dadurch sollte der aufwändige Vorgang der *in vivo*-Inkorporation umgangen werden. Für die visuelle Lokalisation des Proteins innerhalb der pflanzlichen Zelle wurden daher mikroskopische Aufnahmen isolierter Protoplasten am CLSM angefertigt. Im Falle von YFP21, für das im Immunoblot keine entsprechende Bande auf die Akkumulation von YFP hinwies, konnte demnach auch in isolierten Zellen mittels CLS-Mikroskopie kein Reporterprotein detektiert werden. Wie sich bei der Untersuchung der übrigen Reporterger-Konstrukte zeigte, konnte die Lokalisation des Proteins innerhalb des Cytosols oder der Chloroplasten aufgrund der beiden 5'-Module 15879 und 20030 deutlich unterschieden werden. Eine Spezifizierung der Lokalisation von YFP an Zellkompartimenten innerhalb der Chloroplasten oder des Cytosols in Abhängigkeit eines potentiellen Lipidrests konnte jedoch nicht erfolgen. Um dennoch eine Aussage über eine vorliegende Lipidmodifikation treffen zu können, wurde deshalb auf die

Inkorporation Tritium-markierter Palmitinsäure zurückgegriffen. Aufgrund der sehr geringen Akkumulationsrate unter Verwendung des 5'-Moduls 20030 konnte eine erfolgreiche *in vivo*-Inkorporation nur für Reporterger-Konstrukte, die in Kombination mit dem 5'-Modul 15879 infiltriert worden waren, durchgeführt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der verkürzten Signalsequenz MALIACK und des eukaryotischen Lipidierungsmotivs MGCK der Konstrukte YFP22 und YFP24 nachweislich zu einer posttranslationalen Palmitylierung nach transients Expression führte, während die Sequenzen der Varianten YFP23 und YFP25 nicht in einer Lipidierung des Reporterproteins resultierten (Tab. 4.4). Das Vorliegen eines Lipidrestes in Abhängigkeit des Signalmotivs MGCK steht in Einklang mit dem Resultat, das nach transients Expression der OspA-Variante OT22 mit identischer Signalsequenz erzielt werden konnte (Hennig, 2006). Wie anhand von Konstrukt OT12 in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wird das eukaryotische Sequenzmotiv MGCK nicht als Lipidierungssignal bei plastidärer Expression erkannt. Im Gegensatz dazu konnte Signalsequenz MALIACK im Rahmen dieser Arbeit bereits als Lipidierungssignal nach stabiler Chloroplastentransformation identifiziert werden (Konstrukt YFP12). Da dieses Motiv nachweislich auch nach Expression im Zellkern zu einer Palmitylierung führt, kann die entsprechende Signalsequenz als allgemeines Palmitylierungsmotiv angesehen werden.

**Tabelle 4.4. Lipidmodifikation der Reporterger-Konstrukte nach transients Expression mit 5'-Modul 15879.** Dargestellt sind die zur transients Expression mit 5'-Modul 15879 verwendeten Reporterger-Konstrukte sowie die jeweils vorliegende N-terminale Signalsequenz. +: Mittels *in vivo*-Isotopenmarkierung detektierte Lipidmodifikation. -: Mittels *in vivo*-Isotopenmarkierung konnte keine Lipidierung detektiert werden.

Konstrukt	N-terminale Signalsequenz	Lipidmodifikation
YFP21	MAKYLLGIGLILALIACK...	Keine Angabe
YFP22	MALIACK...	+
YFP23	MACK...	-
YFP24	MGCK...	+
YFP25	M...	-

Inwieweit sich die vorliegenden Lipidmodifikationen der Varianten YFP22 und YFP24 sowohl untereinander als auch von der Pam<sub>2</sub>Cys-Modifikation nach plastidärer Expression unterscheiden, sollte zukünftig mittels massenspektrometrischer Untersuchung geklärt werden. Dadurch könnte auch dargelegt werden, ob identische Signalsequenzen im Falle von Sequenz MALIACK in verschiedenen Zellkompartimenten zu identischen oder unterschiedlichen Modifikationen führen. Das Vorliegen einer identischen posttranslationalen Lipidmodifikation würde dabei Hinweise auf eine mit eukaryotischen Mechanismen vergleichbare Lipidierungsmaschinerie im Chloroplasten liefern und Einblick in die bisher noch wenig geklärten Vorgänge der posttranslationalen Lipidmodifikation in Plastiden geben. Wie beschrieben, konnte die Lipidmodifikation für YFP22 und YFP24 anhand einer visuellen Lokalisation an Membrankompartimenten der Zelle mittels CLS-Mikroskopie nicht bestätigt werden. Als mögliche Erklärung hierfür könnte eine unvollständige Lipidierung des akkumulierten Proteins genannt werden. Für transplastome OA12-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass ein Teil des rekombinanten Proteins OA12 in unlipidierter Form im Stroma der Chloroplasten vorliegt (Glenz et al., 2006). Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch nach transienter Expression die Lipidierung unvollständig verläuft und ein Teil des synthetisierten Proteins in einer unprozessierten Form im Stroma vorliegt und die Differenzierung von lipidierten und unlipidierten Proteinen anhand einer visuellen Detektion erschwert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das ICON-System eine Möglichkeit zur raschen Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen darstellt. Für lösliche Proteine und Konstrukte ohne beziehungsweise mit verkürzter N-terminaler Lipidierungssequenz kann damit eine effektive Produktion in Tabakpflanzen erfolgen. Unter Verwendung eukaryotischer Lipidierungsmotive (für Konstrukt OT22; Hennig, 2006) oder modifizierter bakterieller Lipidierungssequenzen konnte eine effektive Synthese rekombinanter Lipoproteine nach transienter Expression bestätigt werden. Inwieweit eine Nukleotidsequenz erfolgreich zur transienten Expression genutzt werden kann, lässt sich jedoch nicht vorhersagen, sondern muss individuell erprobt werden. Als Tendenz ließ sich aber erkennen, dass die transiente Expression von Konstrukten mit bakteriellen Lipidierungssequenzen Limitationen unterworfen ist. Resultat sind geringe Akkumulationsraten (0.15% des LGP) des rekombinanten Proteins, die eine quantitative Nutzung des Systems zur Produktion bakterieller Lipoproteine zunächst ausschließen.

### 4.3 Immunogenität von OspA-Pflanzenmaterial

Die immunogene Eigenschaft von gereinigtem rekombinantem OspA aus *E. coli* in Mäusen und Menschen konnte in den vergangenen Jahren anhand zahlreicher Studien belegt werden (Van Hoecke et al., 1996; Luke et al., 1997; Poland & Jacobson, 2001) und gipfelte schließlich in der Einführung des humanen Impfstoffes LYMERix durch die Firma SmithKline Beecham. Das immunogene Potential von OspA wird dabei in erster Linie dem Fettsäurerest des Proteins zugeschrieben. Dass auch rekombinant in Plastiden von *N. tabacum* synthetisiertes OspA trotz modifizierter Lipidstruktur (Pam<sub>2</sub>Cys) zur Bildung reaktiver Antikörper führt, konnte 2006 nach parenteraler Verabreichung an Mäusen bestätigt werden (Glenz et al., 2006).

Im Sinne der Nutzung von Pflanzen als Bioreaktoren zur Erzeugung „essbarer Impfstoffe“ wurde in der vorliegenden Arbeit das immunogene Potential von rpOspA nach oraler Applikation geprüft. Die Pfropfung transplastomer OspA-Pflanzen auf Tomatensprosse zur Reduktion des endogenen Nikotingehalts war dafür eine Voraussetzung und konnte erfolgreich durchgeführt werden. Als Ergebnis der Pfropfungsversuche konnte eine Reduktion des toxischen Alkaloids auf durchschnittlich 78 µg/g TG in den Blättern transplastomer Pflanzen erzielt werden, ohne den Gehalt an gebildetem rekombinantem OspA maßgeblich zu beeinflussen. Der gemessene Nikotingehalt lag dabei in einer Skala von 9 bis 220 µg/g TG, was auf eine individuelle Variation an Sekundärmetaboliten verschiedener Pflanzen zurückzuführen ist. Berücksichtigt man den Gehalt an rpOspA in OA12-Pflanzen von 1% des LGP, ist zur Verabreichung einer Dosis von 5 µg OspA eine Applikation von 5 mg Trockenmaterial notwendig. Auch bei der maximal gemessenen Nikotinkonzentration von 220 µg/g TG würde dabei die letale Dosis (LD<sub>50</sub>) von 3 mg/kg Körpergewicht für Mäuse mit einem Wert von 1 µg bei Weitem unterschritten. In den ersten Fütterungsversuchen zeigte sich, dass eine orale Applikation von gereinigtem rekombinantem bakteriellem OspA (rbOspA) oder von transgenem OspA-Pflanzenmaterial durchaus die Bildung reaktiver Antikörper induzierte. Im Vergleich zu einer subkutanen Immunisierung mit rbOspA war der gebildete Antikörpertiter jedoch um einen Faktor 40 – 100 reduziert. Während für Erreger, die Infektionen durch einen Befall der Schleimhaut des Gastro-Intestinal-Trakts auslösen eine Antikörperbildung durch eine Induktion der Mukosa hervorgerufen wird, ist zur Erzeugung einer systemischen Immunantwort zunächst die Passage des Antigens in den Blutkreislauf notwendig (Molina et al., 2004), die jedoch durch die geringe Permeabilität der intestinalen Epithelschicht begrenzt ist (Hamman et al., 2005).

Diese Tatsache stellt neben der Degradation des Antigens während der Magen-Darm-Passage (De Aizpurura & Russell-Jones, 1988) einen limitierenden Faktor für die Antigenkonzentration im Blutkreislauf dar und kann als Ursache der verminderten Antikörperinduktion im Falle der oralen Applikation von OspA in Betracht gezogen werden. Desweiteren wurde der OspA-Gehalt der applizierten Dosis von 5 mg transgenem Pflanzenmaterial durchschnittlich mit 5 µg berechnet. Es ist aber nicht auszuschließen, dass der tatsächliche OspA-Gehalt zwischen den einzelnen Dosen variierte. Dadurch ließen sich Unterschiede bezüglich der gemessenen Antikörpertiter der Versuchstiere von Gruppe 1 erklären. Die Induktion einheitlicher und höherer Antikörpertiter sollte jedoch durch die Verabreichung größerer Dosen Antigen möglich sein, so dass die das Immunsystem effektiv stimulierende Menge an Vakzin im Körper erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit könnte auch die Fusion von OspA an einen Liganden darstellen, der die intestinale Absorption des intakten Proteins erhöht. Durch die Fusion von GFP an die Cholera-Toxin B-Untereinheit konnten Limaye *et al.* (2006) eine gesteigerte GFP-Aufnahme über die GM1-Rezeptoren der Enterocyten des Darmepithels in den Blutkreislauf bewirken. Diese Möglichkeit zur Verstärkung der systemischen Immunantwort wäre auch für andere Antigene wie zum Beispiel OspA denkbar.

Erste Untersuchungen zum immunogenen Potential von plastidärem OspA im Vergleich zu rekombinantem OspA aus *E. coli* wurden durch subkutane Injektion einer gereinigten Form von rpOspA an Mäusen vorgenommen (Glenz, 2005). Dabei konnte das immunogene Potential von rpOspA bestätigt werden, die induzierte Immunantwort von rpOspA fiel jedoch schwächer aus als für rekombinantes OspA aus *E. coli*. Dieses Ergebnis wurde zum einen mit der unvollständigen Palmytylierung in Form der Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur von rpOspA begründet, zum anderen mit einer möglichen Denaturierung von rpOspA, bedingt durch das Aufreinigungsverfahren des Proteins aus dem Pflanzenmaterial. Wie die nun vorliegenden Ergebnisse zeigen, konnte bei oraler Applikation von transgenem Pflanzenmaterial eine 4-fach stärkere Immunantwort induziert werden als durch orale Verabreichung einer gereinigten Form von rbOspA aus *E. coli*. Als Gründe hierfür können zum einen die Verpackung, die sogenannte „Bioencapsulation“ des Vakzins im Pflanzenmaterial genannt werden (Limaye *et al.*, 2006). Dadurch ist das Protein während der Passage durch den Verdauungstrakt vor degradierenden Einflüssen wie Magensäure oder Proteasen geschützt, so dass eine größere Menge an reaktivem Protein das Darmepithel erreicht. Außerdem entfällt das Risiko einer Aufreinigungs-bedingten Protein-Denaturierung, was die Menge an



reaktivem Protein zusätzlich erhöht. Ein weiterer Punkt, der die gesteigerte immunogene Wirkung des Pflanzenmaterials erklärt, könnte die Anwesenheit von Alkaloiden im Pflanzenextrakt sein. Wie Heal *et al.* (2001) zeigen konnten, besitzt Tomatin, ein Glykoalkaloid aus Tomatenpflanzen, eine immunstimulatorische Wirkung, die durch einen verzögerten Beginn der erythrocytischen Infektion bei mit Plasmodien infizierten Mäusen gekennzeichnet war. Zusätzlich konnte bei Immunisierungen mit Antigen und Tomatin, im Vergleich zu einer Immunisierung der Versuchstiere ohne Tomatin, eine signifikant erhöhte Interferon-Sekretion als auch eine gesteigerte Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Arbeiten von Rajanathanan *et al.* (2000), die zeigen konnten, dass eine Immunisierung von Mäusen mit einer auf Tomatin basierenden Präparation als Adjuvanz in Verbindung mit Ovalbumin als Antigen die Induktion höherer Antikörpertiter hervorrief als gebräuchliche Standard-Adjuvantien. Transmission-Elektronen-mikroskopische Aufnahmen konnten die Bildung molekularer Komplexe der auf Tomatin-basierenden Präparation darlegen, die mit den Strukturen von immunstimulatorischen Saponin-Glykosiden vergleichbar sind.

Die Bildung des Glykoalkaloids Tomatin findet vor allem im meristematischen Gewebe von Spross und Wurzel statt. Von dort wird es zum Fraßschutz vor Insekten in die Blätter und Früchte der Pflanze transportiert, wo hohe Konzentrationen von 18 mg/g FG für unreife Früchte und 2 mg/g FG für Blätter von *Lycopersicon esculentum* nachgewiesen werden konnten (Kozukue *et al.*, 2004). Eine Akkumulation von Tomatin in den Blättern der auf Tomatenwurzelstöcke gepfropften Tabakpflanzen ist daher wahrscheinlich und kann für die gesteigerte immunstimulatorische Wirkung nach Verabreichung von Blattmaterial im Vergleich zur Applikation von gereinigtem OspA in Betracht gezogen werden. Die Anwesenheit dieser reaktiven Inhaltsstoffe kann zudem die immunstimulatorische Wirkung von OT-Extrakten im Fütterungsversuch mit *P. leucopus* erklären: Während Erdile *et al.* (1993) nach parenteraler Verabreichung von nicht-lipidiertem OspA (OT) in Abwesenheit eines Adjuvanz keine immunstimulatorische Wirkung hervorrufen konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt, dass in Verbindung mit endogenen Inhaltsstoffen der gepfropften Pflanzen im Fütterungsversuch eine Immunantwort von OT-Extrakten induziert wurde. Zur Kalkulation des Gehalts von rpOspA im Trockenextrakt der OT-Pflanzen wurde der Anteil von OspA am LGP mit lediglich 10% festgelegt. Der Gehalt von rpOspA im Blattmaterial nicht gepfropfter OT12-Pflanzen konnte nach semiquantitativer Proteinbestimmung jedoch auf 20% des LGP bestimmt werden. Auch unter Berücksichtigung der Annahme, dass der tatsächliche Gehalt an reaktivem Antigen im TE der OT12-Pflanzen

über der kalkulierten Proteinkonzentration lag, kann man davon ausgehen, dass die Induktion protektiver Antikörper weniger auf einen höheren Gehalt an reaktivem Antigen als auf die Anwesenheit immunstimulatorischer Substanzen zurückzuführen ist. Es liegt nahe, dass Tomatin oder andere Sekundärmetabolite der Solanaceen-Gewächse als Adjuvanz in den Blattextrakten fungieren und für den immunstimulatorischen Effekt von nicht-lipidiertem OspA verantwortlich gemacht werden können. Eine Lipidierung von rpOspA scheint daher für die Immunisierung mittels Blattmaterial oder Pflanzenextrakt nicht erforderlich. Da *N. tabacum* wie *S. lycopersicum* der Familie der Solanaceen angehört, ist es nicht auszuschließen, dass auch in Tabakpflanzen sekundäre Metabolite mit vergleichbarer immunstimulatorischer Wirkung wie Tomatin enthalten sind. Durch die Transformation von Tabaksorten mit geringem Nikotingehalt, wie sie bereits zur rekombinanten Synthese mikrobieller Zellulase (Yu et al., 2007) oder Erythropoietin (Conley et al., 2010) verwendet wurden, sollte eine wirtschaftliche Produktion von immunstimulatorischem Blattmaterial ohne den aufwändigen Vorgang einer Pfropfung gewährleistet werden können.

Obgleich die vorliegenden Versuche zur oralen Immunisierung noch rudimentär sind, konnte mit ihnen eindeutig das immunogene Potential von OA- und vor allem OT-Pflanzen nach oraler Applikation belegt werden. In weiterführenden Untersuchungen sollte eine optimale Dosis an Blattextrakt, die zur Induktion einer gesteigerten Immunantwort führt, bestimmt werden. In einem zweiten Schritt kann dann untersucht werden, ob der induzierte Antikörpertiter die Versuchstiere vor einer Infektion mit *B. burgdorferi* schützt.

Im Hinblick auf die Problematik des Vakzins LYMErix und der zuletzt mangelnden Akzeptanz in der Bevölkerung wäre als alternativer Schritt im Zuge der Borreliose-Prophylaxe die Möglichkeit einer Immunisierung des Erreger-Reservoirs denkbar. Aus der Reduktion der Abundanz des Borreliose-Erregers in den Zecken würde ein vermindertes Infektionsrisiko für den Menschen resultieren. Im Falle von Lyme-Borreliose stellen neben Rotwild vor allem Mäuse das Reservoir von *B. burgdorferi* dar. Wie Tsao et al. (2004) zeigen konnten, wurde durch eine Immunisierung der amerikanischen Weißfußmaus mit OspA die durchschnittliche Prävalenz von *B. burgdorferi* in Ixodes-Nymphen um 19-25% gesenkt. Während die Immunisierung in dieser Studie durch subkutane Injektion erfolgte, wäre im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse eine rasche und kostengünstige Immunisierung durch die Verteilung von Impfstoffködern, die Blattmaterial oder Pflanzenextrakte transplastomer OspA-Pflanzen enthalten, denkbar.

#### **4.4 Fazit: Bedeutung bakterieller Signalsequenzen für die Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen**

Die Synthese rekombinanter Proteine in unterschiedlichen Organismen unterliegt vielfältigen Einflüssen. Neben der Identität der kodierenden Nukleotide im Hinblick auf Kodon-Usage (Tregoning et al., 2003) und Einfluss der Downstream-Box (Nishikubo et al., 2005) auf die Transkriptionsrate spielen bei der Nutzung transplastomer Pflanzen als Bioreaktoren für die Produktion rekombinanter Proteine vor allem posttranskriptionale Prozesse eine entscheidende Rolle (del Campo, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer bakteriellen Signalsequenz einen weiteren Faktor darstellt, der die Produktion rekombinanter Proteine entscheidend beeinflusst und dies unabhängig von ihrem Lipidierungspotential. Im Falle transplastomer Pflanzen stellt die bakterielle Signalsequenz aufgrund ihrer Assoziation zu den Membranen des Thylakoidsystems und einer dadurch bedingten Inhibierung des Photosystems einen limitierenden Faktor für die Vitalität der Pflanze und die Akkumulationsrate des Proteins dar. Für weniger Protease-resistente Proteine wie YFP kommt es unter der Präsenz einer bakteriellen Signalsequenz trotz hoher Transkriptionsraten zu einer fehlenden Akkumulation des rekombinanten Proteins, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine proteolytische Degradation des Proteins zurückzuführen ist. Dass dieser Effekt auch auf andere Proteine beziehungsweise bakterielle Lipidierungsmotive übertragbar ist, konnte am Beispiel des Outer membrane Protein Omp19 gezeigt werden (Borkowski, 2007).

Der negative Einfluss bakterieller Signalsequenzen auf die Transgenexpression kann auch für die transiente Expression bakterieller Lipoproteine geltend gemacht werden, wie in der vorliegenden Arbeit anhand der OspA- und Reporter-gen-Konstrukte gezeigt werden konnte. Der inhibitorische Effekt der bakteriellen Voll-längesignalsequenz auf die Expressionsrate war hier deutlich ersichtlich und konnte durch Verkürzung der Signalsequenz revidiert werden. Im Falle der transienten Expression von Lipobox 21 konnte selbst die Expression einer endogenen, aber kompartimentsfremden Signalsequenz nicht erfolgen. Diese Ergebnisse verdeutlichen den variablen Einfluss von Sequenzmotiven auf die Transgenexpression und Proteinakkumulation in Abhängigkeit der Identität des vorliegenden Sequenzmotivs und des Expressionsortes innerhalb eines Organismus.

Für die zukünftige Produktion von bakteriellen Lipoproteinen in pflanzlichen Produktionsplattformen lässt sich bisher keine einheitliche Aussage über eine mögliche Lipidierung, die Akkumulationsrate oder Pflanzenvitalität in Abhängigkeit einer

Lipidierungssequenz machen, sondern muss von Fall zu Fall erprobt werden. Für lösliche Proteine, wie auch für die OspA-Varianten OT12 und OT13, für die die immunstimulatorische Eigenschaft des Lipdreasts durch sekundäre pflanzliche Inhaltsstoffe kompensiert werden kann, stellen pflanzliche Bioreaktoren vielversprechende Plattformen zur Produktion therapeutisch relevanter Proteine dar.

### 5. Zusammenfassung

Zur Produktion therapeutisch relevanter Proteine stellen Pflanzen als Bioreaktoren kostengünstige Alternativen zu den herkömmlich genutzten Produktionsplattformen tierischer und prokaryotischer Zellen dar. Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität therapeutischer Proteine ist eine korrekte posttranslationale Modifikation innerhalb der Pflanzenzelle. Proteine mit großem therapeutischen Potential sind bakterielle Lipoproteine, die als Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) vom Immunsystem erkannt werden und die Bildung reaktiver Antikörper stimulieren, wodurch sie erfolgreich als Impfstoffe gegen bakterielle Infektionskrankheiten genutzt werden können. Anhand des lipidierten bakteriellen Oberflächenproteins OspA des Spirocheten-Bakteriums *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, konnte bereits gezeigt werden, dass Pflanzen zur Lipidmodifikation bakterieller Proteine fähig sind (Glenz et al., 2006). Transplastome Tabakpflanzen akkumulierten dabei eine lipidierte Form von OspA bis zu 1% des LGP, wobei die resultierende Lipidmodifikation im Chloroplasten unvollständig verlief. Wie sich in der vorliegenden Arbeit herausstellte, konnte die Proteinakkumulation von rekombinantem plastidärem OspA (rpOspA) in transplastomen Pflanzen durch einen alternativen Integrationsort im Chloroplastengenom von 1% auf 10%- 20% des LGP gesteigert werden und das zur Lipidierung nötige minimale Sequenzmotiv bestimmt werden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass das Cystein an Position +1 innerhalb der N-terminalen Signalsequenz eine zur Lipidmodifikation essentielle Aminosäure darstellt. Weiter konnte dargelegt werden, dass rpOspA in Abhängigkeit der zur Lipidierung notwendigen bakteriellen Signalsequenz in Assoziation zu den Membranen des Thylakoidsystems vorliegt und diese Lokalisation unabhängig von einer vorhandenen Lipidierung des Proteins erfolgt. Als Folge der Lokalisation des rekombinanten Proteins an den photochemisch aktiven Membranen konnte eine Störung des photosynthetischen Apparats und ein damit verbundener Vitalitätsverlust transplastomer Pflanzen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in Abwesenheit einer Volllängesignalsequenz die Akkumulation einer nicht lipidierten Variante im plastidären Stroma bis zu einem Gehalt von 20% des LGP erhöht, ohne die Vitalität der Pflanzen zu beeinflussen. Neben der sterischen Inhibierung photochemisch aktiver Membranen konnte zudem ein negativer Effekt der Präsenz der bakteriellen Signalsequenz auf die Proteinstabilität beobachtet werden, der zu einer mangelnden Akkumulation des rekombinanten Proteins führte. Dieser Effekt konnte für weniger Protease-resistente Proteine wie YFP beobachtet werden, wobei eine Stabilisierung durch eine Fusion an das Protease-

resistente OspA erzielt werden konnte.

Neben den inhibitorischen Effekten der bakteriellen Signalsequenz von OspA auf Proteinakkumulation und Pflanzenvitalität transplastomer Pflanzen konnte auch unter Verwendung eines transienten Expressionssystems ein negativer Einfluss der bakteriellen Lipidierungssequenzen auf die Proteinakkumulationsrate festgestellt werden. Dieser war im Gegensatz zur plastidären Expression unabhängig vom Protease-resistenten Charakter des zu synthetisierenden Proteins. Ein Entfernen oder Verkürzen der N-terminalen Signalsequenz resultierte für beide Produktionssysteme in einer gesteigerten Proteinakkumulation.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine effektive Produktion bakterieller Lipoproteine im Bioreaktor Pflanze daher zunächst nicht gegeben. Immunologische Untersuchungen an Mäusen zeigten jedoch, dass eine orale Applikation von transgenem OspA-Pflanzenmaterial, unabhängig vom Lipidierungsstatus des rekombinanten Proteins, zu einer Bildung reaktiver Antikörper führte. Im Falle einer Applikation von transgenem Pflanzenmaterial ist damit die Lipidierung von OspA für den therapeutischen Nutzen nicht zwingend erforderlich, so dass eine effektive Produktion einer OspA-Variante ohne bakterielle Signalsequenz in transplastomen Pflanzen kostengünstig erfolgen kann.

## 6. Summary

In comparison with commonly used production systems like animal or prokaryotic cells, plants resemble a cheap production platform for recombinant proteins. When used as therapeutics the correct posttranslational modification of the recombinant proteins within the plant cell is an essential factor with great influence on the protein's proper physiological function. Bacterial lipoproteins belong to the family of so called pathogen associated molecular patterns (PAMPS) and are highly immunogenic. Because they are easily recognized by the host's immune system yielding in the production of reactive antibodies, they can successfully be used as vaccines against bacterial infectious diseases. A prominent example is the outer membrane protein A (OspA) of the spirochete bacterium *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme-disease. The production of OspA inside the chloroplasts of transplastomic tobacco plants gave proof that plants are capable of posttranslational lipid modification due to bacterial signal sequences (Glenz et al., 2006), although the lipid modification is not identical to that found in bacterial cells. The fraction of recombinant plastidal OspA in transplastomic plants reached 1% of total soluble protein.

In the present study the accumulation level of recombinant OspA in transplastomic tobacco plants could be increased up to 10%-20% of TSP by usage of an alternative expression site within the chloroplast's genome. Beside the identification of the minimum signal sequence that is required for protein lipidation within the chloroplast it could be shown that the cystein residue at position +1 within the bacterial signal sequence is as essential for lipid modification in bacterial cells as in plastids. Due to the presence of the full length signal sequence the protein was found to be attached to the thylakoid membranes and this was independent of the lipidation status of the protein. As a result of the localization at photosynthetic active membranes inhibition of PS II function could be detected, leading to a reduced viability of transplastomic plants. However, in the absence of the bacterial full length signal sequence protein accumulation of an unlipidated form of OspA reached 20% of TSP without interfering with photosynthetic functions or reduction of plant viability. Additional to the steric interference in photosynthetic membranes the full length signal sequence was also found to have negative influence on protein stability yielding in low protein accumulation levels. This effect was reported for less stable proteins like YFP. Nevertheless the stability of YFP could be maintained by fusion to the protease resistant protein OspA.

Beside the effects of the bacterial signal sequence on protein stability and plant viability, which were detected for transplastomic plants some negative influence of the bacterial signal

sequence related to the protein accumulation level could also be shown in transient expression experiments. In contrast to transplastomic plants this effect was independent of the protease resistant nature of the protein. For both expression systems the deletion or truncation of the bacterial signal sequence resulted in an increased protein accumulation level.

Due to these results it is obvious that reasonable expression of bacterial lipoproteins using plants as production platform is not feasible. However, immunological studies with mice revealed that oral application of plant material harbouring a truncated, non-lipidated form of OspA elicits a specific immune response. Taken together this result indicates that the lipid modification of OspA is not mandatory to induce specific antibodies after oral immunization and that the plant matrix might have additional adjuvant activity.



## 7. Literaturverzeichnis

**Adjobo-Hermans M., Goedhart J., Gadella T.** (2006): Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of G $\alpha$  and G $\gamma$  and do not dissociate upon activation. *Journal of Cell Science* 119: 5087-5097

**Apel W., Schulze W.X., Bock R.** (2010): Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant Journal* 63(4): 636-650

**Arakawa T., Chong D.K., Langridge W.H.** (1998): Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat. Biotechnol.* 16: 292-297

**Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A.M., Oisji K.K., Daniell H.** (2007): Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnol. J* 5: 511-525

**Austin II J. R., Frost E., Vidi P-A., Kessler F., Staehelin L. A.** (2006): Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell*. 18: 1693-1703

**Babu M.M. & Sankaran K.** (2002): DOLOP-database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics* 18: 641-643

**Babu M.M., Priya M.L., Selvan A.T., Madera M., Gough J., Aravind L., Sankaran K.** (2006): A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predict lipoproteins. *J. Bacteriol.* 188: 2761-2773

**Baker N.** (2008): Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113

**Bally J., Paget E., Droux M., Job C., Job D., Dubald M.** (2008): Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnol J.* 6(1): 46-61

**Barta A., Sommergruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M.A., Matzke A.J.M.** (1986): The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant. Mol. Biol.* 6: 347-357

**Belanger C., Ansanay H., Qanbar R., Bouvier M.** (2001): Primary sequence requirements for S-acylation of beta(2)-adrenergic receptor peptides. *FEBS Lett.* 499: 59-64

**Birch-Machin I., Newell C.A., Hibberd J.M., Gray J.C.** (2004): Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant biotechnol. J.* 2: 261-270

**Birnboim H. H., Doly J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523

**Björkman O., Demmig B.** (1987): Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504

**Blum H., Beier H., Gross H.J.** (1987): Improved silver staining of proteins, RNA, DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99

**Bock R.** (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312:425-438.

**Bock R., Warzecha H.** (2010): Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. *Trends Biotechnol.* 5: 246-252

**Borkowski J.** (2007): Untersuchung der Lipidierung von Proteinen in Tabak. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg

**Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R.** (1988): Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538

**Braun V. & Rehn K.** (1969): Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* 10: 426-438

**Burgdorfer W., Barbour A.G., Heyes S.F., Benach J.L., Grunwald E., Davis J.P.** (1982): Lyme disease- a tick-borne spirochetosis. *Science* 216: 1317-1319

**Charron G., Wilson J., Hang H.C.** (2009): Chemical tools for understanding protein lipidation in eukaryotes. *Current opinion in Chemical Biology* 13: 382-391

**Conley A.J., Jevnikar A.M., Menassa R., Brandle J.E.** (2010): Temporal and spatial distribution of erythropoietin in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 19: 291-298

**Corvi M.M., Soltys C.L., Berthiaume L.G.** (2001): Regulation of mitochondrial carbamoyl-phosphate synthetase 1 activity by active site fatty acylation. *J. Biol. Chem.* 276: 45704-45712

**Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K.** (2001.1): *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants.* Trends in Plant Science 6(5): 219-226

**Daniell H., Lee S.B., Panchal T., Wiebe T.O.** (2001.2): Expression of the native cholera toxin B subunit gene in assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J- Mol. Biol.* 311: 1001-1009

**Danon A.** (1997): Translational regulation in the chloroplast. *Plant Physiol.* 115(4): 1293-1298

**De Aizpurua H.J., Russell-Jones G.J.** (1988): Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med.* 167(2):440-51.

**De Cosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H.** (2001): Over expression of the cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals.

**Del Campo E.M.** (2009): Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. *Gene Regul Syst Bio.* 3:31-47

**Di Cola A., Bailey S., Robinson C.** (2005): The thylakoid delta pH/delta psi are not required for the initial stages of Tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts. *J Biol Chem.* 280(50): 41165-41170

**Dingerman T., Zündorf I.** (2010): Rekombinante Wirkstoffe in Europa. Online im WWW unter URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=35238> [10.12.2010]

**Ding W., Huang X., Yang X., Dunn J. J., Luft B. J., Koide S., Lawson C. L.** (2000): Structural identification of a key protective B-cell epitope in Lyme disease antigen OspA. *J. Mol. Biol.* 302: 1153-1164

**Duncan J.A. & Gilman A.G.** (2002): Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-protein thioesterase 1, the enzyme responsible for G protein alpha subunit deacylation in vivo. *J. Biol. Chem.* 277(35):31740-52

**Dunn J.J., Lade B.N., Barbour A.G.** (1990): Outer surface protein (OspA) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*: high level expression and purification of a solublerecombinant form of OspA. *Protein Expression and Purification.* 1: 159-168

**Erdile L. F., Brandt M-A., Warakowski D. J., Westrack G. J., Sadziene A., Barbour A. G., Mays J. P.** (1993): Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Infection and Immunity.* 61: 81-90

**Faye L., Gomord V.** (2010): Success stories in molecular farming – a brief overview. *Plant Biotechnology Journal* 8(5): 525-528

**Fernández-San Millán A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H.** (2003): A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol. J.* 1: 71-79

**Farazi T.A., Waksman G., Gordon J.I.** (2004): The Biology and Enzymology of protein N-Myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276: 39501-39504

**Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T.** (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18: 265-276

**Fikrig E., Telford III S.R., Barthold S.W., Kantor F.S., Spielman A., Flavell R.A.** (1992): Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 5418-5421.

**Fraley R.T., Rogers S.G., Hoersch R.B., Sanders P.R., Flick J.S.** (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807

**Gießen H.** (2007): Hilfsstoffe für bessere Vakzinen. *PZ online* 48 (2007). Online im WWW unter URL:<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=4206&type=0> [26.01.2010]

**Gleba Y., Marillonnet S., Klimyuk V.** (2004): Engineering viral expression vectors for plants: the full virus and the deconstructed virus strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 182-188

**Glenz K.** (2005): A recombinant bacterial lipoprotein vaccine from higher plant chloroplasts. *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg

**Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M.M., Warzecha H.** (2006): A recombinant bacterial lipoprotein vaccine from higher plant chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 24: 76-77

**Golds T., Maliga P., Koop H-U.** (1993): Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technol* 11: 95-97

**Golfsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.** (2009): Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth Res* 101: 217-232

**Gomez-Gomez L., Felix G., Boller T.** (1999:) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 277-284

**Gralnik J.; Vali H., Lies D.P., Newman D.K.** (2006): Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 103: 4669-4674

**Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P. E., Krum J. G., Bueschel D. M., Schwan T. G., Policastro P. F., Elias A. F., Rosa E. A.** (2004): Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *PNAS*. 101: 3142-3147

**Guerau-de-Arellano M., Huber B.T.** (2005): Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis. *Trend in Molecular Medicine* 11(3): 114-120

**Hamman J.H., Enslin G.M., Kotze A.F.** (2005): Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs* 19:165-177

**Hannoush R.N., Sun J.** (2010): The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat Chem Biol* 6: 498-506

**Hansson L., Noppa L., Nilsson A.K., Strömqvist M., Bergström S.** (1994): Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 6: 15-24

**Hantke K., Braun V.** (1973): Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amid-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 34: 284-296

**Harper B.K., Mabon S.A., Leffel S.M., Halfhill M.D., Richards H.A., Moyer K.A., Stewart C.N.** (1999): Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 17: 1125-1129#

**Hayashi S., Wu H.** (1985): Accumulation of prolipoprotein in *Escherichia coli* mutants defective in protein secretion. *Journal of Bacteriology* 161(3): 949-954

**Hayashi S. und Wu H. C.** (1990): Lipoproteins in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 22: 451-471

**Heal K.G., Sheikh N.A., Hollingdale M.R., Morrow W.J.W., Taylor-Robinson A.W.** (2001): Potentiation by a novel alkaloid glycoside adjuvant of a protective cytotoxic T cell immune response specific for a preerythrocytic malaria vaccine candidate antigen. *Vaccine* 19: 4153-4161

**Hemsley P.A. & Grierson C.S.** (2008): Multiple roles for protein palmitoylation in plants. *Trends Plant Sci* 13: 295-302

**Hennig A.C.** (2006): Untersuchungen zur Lipidmodifikation rekombinanter Proteine in Tabak. *Diplomarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg

**Hervas M., Navarro J.A., De la Rosa M.A.** (2003): Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Accounts Chemical Research* 36: 798-805

**Herz S., Füßl M., Steiger S., Koop H.U.** (2005): Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. *Trans Res* 14: 969-982

**Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.** (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76-78

**Hirschfeld M., Kirschning C.J., Schwandner R., Wesche H., Weis J.H., Wooten R.M., Weis J.J.** (1999): Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163: 2382-2386

**Hutchings M.I., Palmer T., Harrington D.J., Sutcliffe I.C.** (2008): Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold'em, knowing when to fold'em. *Trends Microbiol.* 17: 13-21

**Jiang Y., Gorevic P.D., Dattwyler R.J., Dunn J.J., Luft B.J.** (1994): Purification of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) and analysis of antibody binding domains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1(4): 406-412

**Kaufmann S.H.E.** (2004): Novel vaccination strategies. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co*

**Knoblauch M., Hibberd J.M., Gray J.C., Van Bel J.A.** (1999): A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol.* 17: 906-909

**Kozukue N., Han J-S., Lee K-R., Friedman M.** (2004): Dehydrotomatine and  $\alpha$ -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2079-2083

**Kramer M.D., Schaible U., Wallich R., Moter S.E., Petzold D., Simon M.M.** (1990): Characterization of *Borrelia burgdorferi* associated antigens by monoclonal antibodies. *Immunobiology* 181: 357-366

**Kusnadi A.R., Zivko L.N., Howard J.A.** (1997): Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech. Bioengin.* 56: 473-484

**Laemmli U.K.**, (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

**Lai J-S., Sarvas M., Brammar W.J., Neugebauer K., Wu H.C.** (1981): *Bacillus licheniformis* penicillinase synthesized in *Escherichia coli* contains a covalently linked fatty acid and glyceride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3506-3510

**Larrick J.W., Yu L., Naftzger C., Jaiswal S., Wycoff K.** (2001): Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Eng.* 18: 87-94

**Lenzi P., Scotti N., Alagna F., Tornosello M.L., Pompa A., Vitale A., De Stradis A., Monti L., Grillo S., Buonaguro F.M., Maliga P., Cardi T.** (2008): Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res.* 17(6): 1091-1102

**Li H., Dunn J.J., Luft B.J., & Lawson C.L.** (1997). Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3584-3589.

**Limaye A., Koya V., Samsam M., Daniell H.** (2006): Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *The FASEB Journal* 20: 37-46

**Lucinski R. & Jackowski G.** (2006): The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochimica Polonica* 53(4): 693-708



**Luke C., Huebner R., Kasmiersky V., Barbour A.** (1997): Oral delivery of purified lipoprotein OspA protects mice from systemic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Vaccine* 15: 739-746

**Luft B. J., Dunn J. J., Lawson C. L.** (2002): Approaches toward the directed design of a vaccine against *Borrelia burgdorferi*. *J. of Infectious Diseases*. 185: 46-51

**Lutz K.A., Maliga P.** (2008): Plastid genomes in a regenerating tobacco shoot derive from a small number of copies selected through a stochastic process. *Plant J.* 56(6): 975-983

**Ma J., Drake P., Christou P.** (2003): The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews* 4:794-805

**Machold O., Meister A.** (1979): Resolution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein of *Vicia faba* chloroplasts into two different chlorophyll-protein complexes. *Biochem Biophys Acta*. 546: 472-480

**Manahan C.L., Patnana L., Blumer K.J., Linder M.E.** (2000): Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11: 957-968

**Maniatis, Sambrook & Fritsch:** Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Marillonet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y.** (2004): *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS* 101: 6852-6857

**Marillonet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y.** (2005): Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*. 23: 718-723

- Martin M.L. & Busconi L.** (2000): Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *The Plant Journal* 24: 429-435
- Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J.** (1992): Expression of Hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11745-11749
- Mason H.S. Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J.** (1998): Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-gene. *Vaccine* 16: 1336-1343
- Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R.** (1995): Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* 27: 1163-1172
- Mattoo A.K. & Edelman M.** (1987): Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (84): 1497-1501
- Molina A., Hervas-Stubbs S., Daniell H., Mingo-Catell A.M., Veramendi J.** (2004): High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.* 2: 141-153
- Morgenfeld M., Segretin M.E., Wirth S., Lentz E., Zelada A., Mentaberry A., Gissmann L., Bravo-Almonacid F.** (2009): Potatoe virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. *Mol. Biotechnol.* 43: 243-249
- Nadelman R.B. & Wormser G.P.** (1998): Lyme borreliosis. *The Lancet* 352(9127): 557-565
- Narita S., Matsuyama S., Tokuda H.** (2004): Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 182: 1-6

**Navarre C., Delannoy M., Lefebvre B., Nader J., Vanham D., Boutry M.** (2006): Expression and secretion of recombinant outer-surface protein A from the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, in *Nicotiana tabacum* suspension cells. *Transgenic Research* 15: 325-335

**Nishikubo T., Nakagawa N., Kuramitsu S., Masui R.** (2005): Improved heterologous gene expression in *Escherichia coli* by optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon. *J. Biotech.* 120: 341-346

**Nunes-Nesi A., Cararri F., Lytovchenko A., Smith A.M.O., Loureiro M.E., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J., Fernie A.R.** (2005): Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* 137: 611-622

**Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R.** (2009): Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The Plant Journal* (57): 436–445

**Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Bogachuk A.S.** (1988): Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett* 230:1-5

**Pal U., de Silva A., Montgomery R.R., Fish D., Anguita J., Anderson J.F. et al.** (2000): Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* 106: 561-569

**Pasquevich A.A., Garcia Samatino C., Coria L.M., Estein S.M., Zwertling A., Ibanez A.E., Barrionuevo P., Olivera F.S., Cavalho N.B., Borkowski J., Warzecha H., Giambartolomei G.H., Cassataro J.** (2010): The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells *in vivo*, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic infection and oral acquired brucellosis. *J. Immunol.* 184: 5200-5212

**Piesman J.** (1993): Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J. Infect. Dis.* 167: 1082-1085

**Poland G.A., Jacobson R.M.** (2001): The prevention of Lyme disease with vaccine. *Vaccine* 19: 2303-2308

**Pozueta-Romero J., Rafia F., Houlne G., Cheniclet C., Carde J-P., Schantz M-L., Schantz R.** (1997): A ubiquitous housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. *Plant Physiol.* 115: 1185-1194

**Quesnel S., Silvius J.R.** (1994): Cysteine-containing peptide sequences exhibit facile uncatalyzed transacylation and acyl-CoA-dependent acylation at the lipid bilayer interface. *Biochemistry* 33: 13340-13348

**Rajananthanan P., Attard G.S., Sheikh N.A., Morrow W.J.W.** (2000): Novel aggregate structure adjuvants modulate lymphocyte proliferation and Th1 and Th2 cytokine profiles in ovalbumin immunized mice. *Vaccine* 18:140-152

**Rezwan M., Grau T., Tschumi A., Sander P.** (2007): Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 153: 652-658

**Richter L.J., Thanavala Y., Arntzen C.J., Mason H.S.** (2000): Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotech.* 18: 1167-1171

**Robichon C., Vidal-Ingigliardi D., Pugsley A.P.** (2005): Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280: 974-983

**Rogalski M., Ruf S., Bock R.** (2006): Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Research* 34(16): 4537-4545

**Rosales-Mendoza S., Alpuche-Solis A.G., Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L., Martinez-Gonzalez L., Herrera-Diaz A., Korban S.S.** (2009): Expression of *Escherichia coli* fusion protein comprising the heat labile B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *The plant Journal* 57: 45-54

**Rousso I., Mixon M.B., Chen B.K., and Kim P.S.** (2000): Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (25): 13523-13525

**Ruf S., Hermann M., Berger I. J., Carrer H., Bock R.** (2001): Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotech.* 19: 870-875

**Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H.** (2007): Oral delivery of chloroplast derived cholera toxin B-proinsulin protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant. Biotechnol. J.* 5: 495-510

**Ruiz-Velasco V., Ikeda S.R.** (2001): Functional expression and FRET analysis of green fluorescent proteins fused to G-protein subunits in rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 537: 679-692

**Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N.** (1987): Delivery of substances into cells and tissue using particle bombardement process. *Part. Sci. Technol.* 5: 27-37

**Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

**Sankaran K. & Wu H.C.** (1994): Lipid modification of bacterial prolipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 19701-19706

**Sargent F. Berks B.C. Palmer T.** (2006): Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 198-207

**Schatz P.J. & Beckwith J.** (1990): Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 24: 215-248

**Schwarz T.F.** (2009): Clinical update of the AS04-Adjuvanted human Papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, cervarix®. *Advances in Therapy* 26: 983-998

**Sears J.E., Fikrig E., Nakagawa T.Y., Deponte K., Marcantonio N., Kantor F.S., Flavell R.A.** (1991): Molecular mapping of OspA mediated immunity against *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *J. Immunol.* 147: 1995-2000

**Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.** (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gel. *Anal. Chem.* 68: 850-858

**Shimada H. & Sugiura M.** (1991): Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 983-995

**Shinshi H., Wenzler H., Neuhaus J-M., Felix G., Hofsteenge J., Meins F.** (1988): Evidence for N-and C-terminal processing of a plant defense-related enzyme: Primary structure of tobacco prepro- $\beta$ -1,3-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5541-5545

**Shrawat A.K., Lörz H.** (2006): Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J.* 4(6): 575-603

**Sigal L. H., Zahradnik J. M., Lavin P., Patella S. J., Bryant G., Haselby R., Hilton E., Kunkel M., Adler-Klein D., Doherty T., Evans J., Malawista S. E.** (1998): A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A to prevent Lyme disease. *The New England Journal of Medicine.* 339: 216-222

**Smotrys J E. & Linder M. E.** (2004): Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 559-587

**Sobek V., Birkner N., Falk I., Würch A., Kirschning C.J., Wagner H., Wallich R., Lamers M.C., Simon M.M.** (2004): Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res. Ther.* 6: 433-446

**Spence E., Sarcina M., Ray N., Moller S. G., Mullineaux C. W., Robinson C.** (2003): Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 48: 1481-1489

**Staub J.M. & Maliga P.** (1993): Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA. *EMBO J.* 12:601-606.

**Staub J. M., Maliga P.** (1994): Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *The Plant Journal* 6: 547-553

**Staub J.M., Garcia B., Graves J., Haidukiewicz P.T.J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D.A.** (2000): High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 18: 333-338

**Steere A.C., Sikand V.K., Meurice F., Parenti D.L., Fikrig E., Schoen R.T., Nowakowski J., Schmid C.H., Laukamp S., Buscarino C., Kruase D.S.** (1998): Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Eng J Med* 339(4): 209-215

**Steere A.C., Coburn J., Glickstein L.** (2004): The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 113: 1093-1101

**Stern D. B., Higgs D. C., Yang J.** (1997): Transcription and translation in chloroplasts. *Trends in Plant Science.* 2: 308-315

**Streatfield S.J., Jilka J.M., Hood E.E., Turner D.D., Bailey M.R., Mayor J.M., Woodard S.L., Beifuss K.K., Horn M.E., Delaney D.E., Tizard I.R., Howard J.A.** (2001): Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19: 2742-2748

**Sugai M., Wu H.C.** (1992): Export of the outer membrane lipoprotein is defective in *secD*, *secE* and *secF* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 2511-1516

**Sutcliffe I.C., Russel R.R.B.** (1995): Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology* 177(5): 1123-1128

**Svab Z., Maliga P.** (1993): High-frequency transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 913-917

**Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G., Clements J. D., Levine M. M., Arntzen C. J.** (1998): Immunogenicity in humans of recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine*. 4: 607-609

**Tacket C. O., Mason H.S., Losonsky G.A., Estes M.K., Levine M.M., Arntzen C.J.** (2000): Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 182: 302-305

**Terada M., Kuroda T., Matsuyama S.I., Tokuda H.** (2001): Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 47690-47694

**Thanassi W. T., Schoen R. T.** (2000): The Lyme disease vaccine: conception, development, and implementation. *Ann. Intern Med.* 132: 661-668

**Thompson G.A. & Okuyama H.** (2000): Lipid-linked proteins of plants. *Progress in Lipid Research* 39: 19-39

**Tissot G., Canard H., Nadai M., Martone A., Botterman J., Dubald M.** (2008): Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J.* 6(3): 309-320

**Traverso J.A., Meinel T., Giglione C.** (2008): Expanded impact of protein N-myristoylation in plants. *Plant Signaling & Behavior* 3: 501-502



**Tregoning J.S., Nixon P., Kuroda H., Svab Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., van Wijk K.J., Dougan G., Maliga P.** (2003): Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 31: 1174-1179

**Treuter E., Nover L., Ohme K., Scharf K. D.** (1993): Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 240:113-125.

**Tsao J.I., Wootton J.T., Bunikis J., Luna M.G., Fish D., Barbour A.G.** (2004): An ecological approach to preventing human infection: Vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 28: 18159-18164

**Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R.** (2003): Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology.* 21: 570-578

**Tzfira T., Citovsky V.** (2006): Agrobacterium-mediated transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 17(2): 147-154

**Van Hoescke C., Comberbach M., De Grave D., Desmons P., Fu D., Hauser P., Lebacqz E., Lobet Y., Voet P.** (1996): Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of three recombinant outer surface protein (OspA) lyme vaccines in healthy adults. *Vaccine* 14 (17/18): 1620-1626

**Verma D., Samson N.P., Koya V., Daniell H.** (2008): A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Protoc.* 3(4): 739-758

**Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M.** (2006): A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27: 2782-2786

**Warzecha H., Hennig A.** (2010): Plastid Transformation, in: Genetic Modification of Plants; Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 64 Kempken F., Jung C. (Eds.) ISBN: 978-3-642-02930-3

**Warzecha H., Mason H.S., Lane C., Tryggvesson A., Rybicki E., Williamson A.L., Clements J.D., Rose R.C.** (2003): Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol.* 77(16): 8702-8711

**Weis J.J., Ying M., Erdile L.F.** (1994): Biological activity of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer surface protein A: dependence on lipid modification. *Infection and Immunity* 62(10): 4632-4636

**Willet T. A., Meyer A. L., Brown E. L., Huber B. T.** (2004): An effective second-generation outer surface protein A-derived Lyme vaccine that eliminates a potentially autoreactive T-cell epitope. *PNAS.* 101: 1303-1308

**Wirth S., Segretin M.E., Mentaberry A., Bravo-Almonacid F.** (2006): Accumulation of hEGF and hEGF-fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light. *Journal of Biotechnology* 125: 159-172

**Wirtz M., Hell R.** (2007): Dominant-negative modification reveals the regulatory function of the multimeric cysteine synthase protein complex in transgenic tobacco. *Plant Cell* 19(2): 625-639

**Wold F.** (1981): *In vivo* chemical modification of proteins (post-translational modification). *Annu Rev Biochem* 150: 783-814

**Wu H.C.** (1996): Biosynthesis of lipoproteins. *Cellular and Molecular Biology* 2(1): 1005-1014

**Yalovsky S., Rodriguez-Concepcion M., Gruissem W.** (1999): Lipid modifications of proteins – slipping in and out of membranes. *Trends Plant Sci* (11): 439-445

**Yu L-X., Gray B.N., Rutzke C. J., Walker L.P., Wilson D.B., Hanson M.R.** (2007): Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplast of nicotine-free tobacco. *Journal of Biotechnology* 131: 362-369

**Ytterberg A.J., Peltier J-B., van Wijk K.J.** (2006): Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology* 140: 984-997

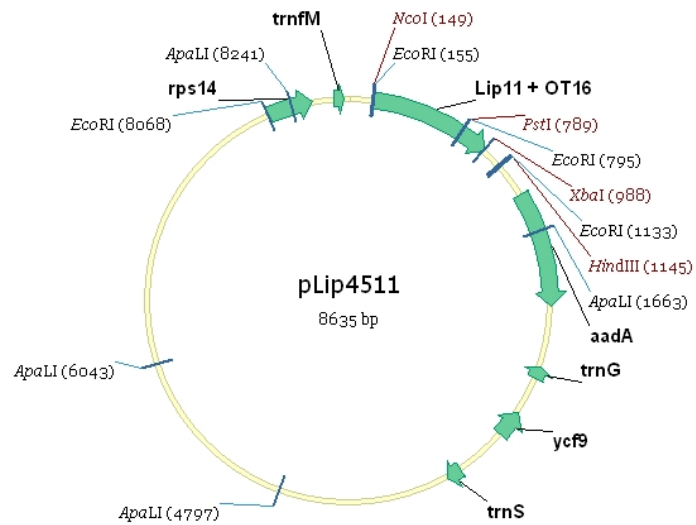
**Zeitlin L., Olmsted S.S., Moench T.R., Co M.S., Martinell B.J., Paradkar V.M., Russell D.R., Queen C., Cone R.A., Whaley K.J.** (1998): A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnol.* 16: 1361-1364

**Zha J., Weiler S., Oh K.J., Wei M.C., Korsmeyer S.J.** (2000): Posttranslational N-Myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290: 1761-1765

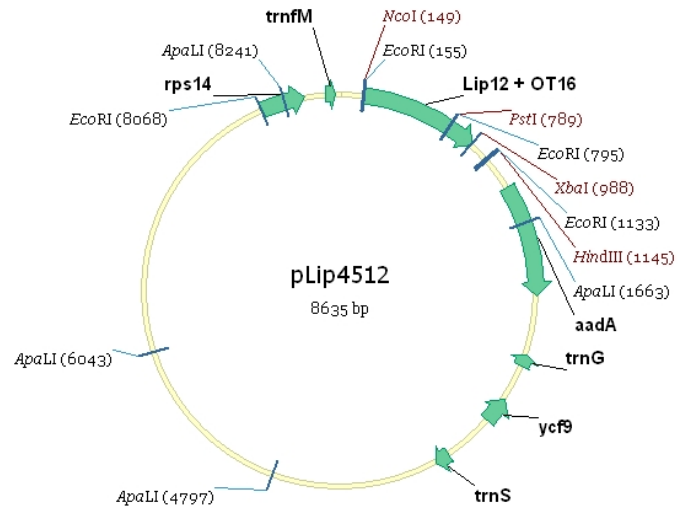
**Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A-M.I., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R.** (2008): High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genome. *Plant Biotechnology Journal* 6: 897-913

**Zhu J-K., Bressnan R.A., Hasegawa P.M.,** (1993): Isoprenylation of the plant molecular chaperon ANJ1 facilitates membrane association and function at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8557-8561

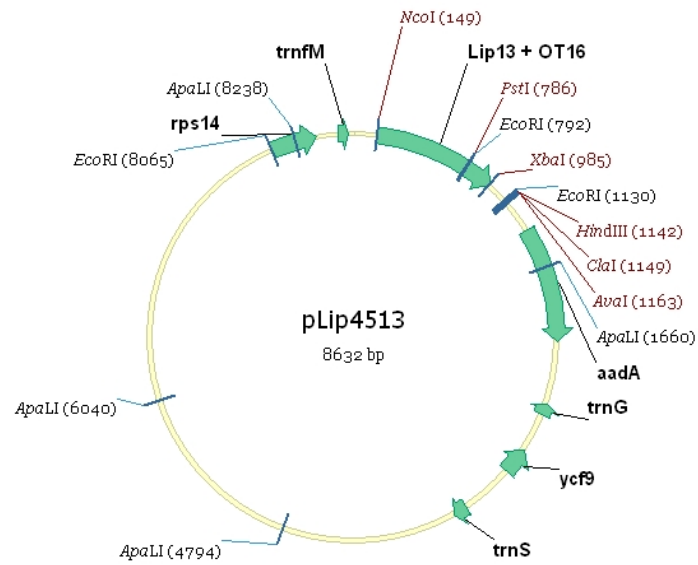
## 8. Anhang



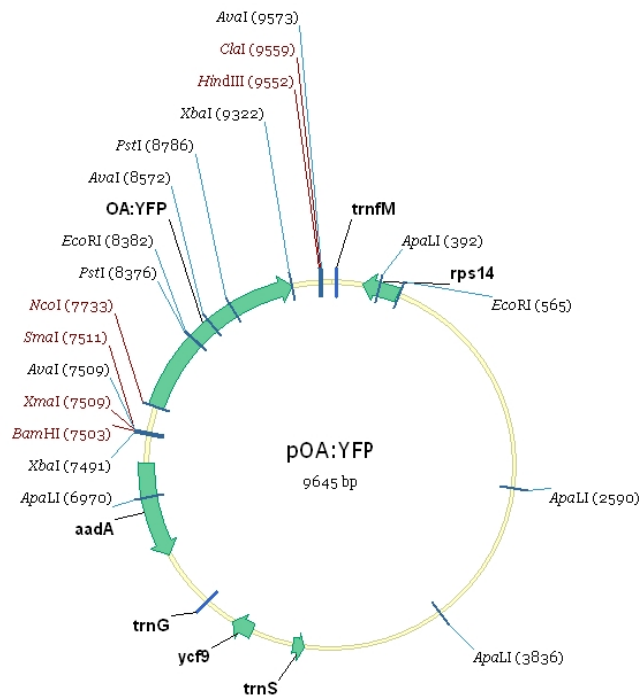
Vektorkarte des Chloroplastenexpressionsvektors pLip4511



Vektorkarte des Chloroplastenexpressionsvektors pLip4512



Vektorkarte des Chloroplastenexpressionsvektors pLip4513



Vektorkarte des Chloroplastenexpressionsvektors pOA:YFP

Tabelle der mittels Pulsed Amperometric Detection ermittelten Konzentrationen löslicher Zucker im Blattextrakt transplastomer OA12- und WT-Pflanzen.

Probe	Verdünnung des zur Analyse verwendeten Extrakts	Detektierter Zucker	Gemessene Zuckerkonzentration in der Probe [ $\mu\text{M}$ ]	Berechnete Zuckerkonzentration im Rohextrakt [ $\mu\text{M}$ ]
WT#2	01:10	Mannit	0.48	4.78
		Glukose	20.48	204.84
		Fruktose	16.50	165.03
		Saccharose	36.10	360.99
WT#4	01:10	Mannit	0.74	7.41
		Arabinose	1.63	16.30
		Glukose	60.58	605.80
		Fruktose	38.46	384.58
		Saccharose	39.58	395.81
WT#6	01:10	Mannit	1.24	12.43
		Arabinose	0.74	7.37
		Glukose	15.11	151.05
		Fruktose	10.24	102.43
		Saccharose	45.10	450.96
OA12#1	01:10	Mannit	0.87	8.71
		Arabinose	3.08	30.80
		Fruktose	123.83	1238.28
		Saccharose	99.40	994.02
OA12#2	01:10	Mannit	0.64	6.36
		Arabinose	2.34	23.40
		Saccharose	133.03	1330.26
OA12#4	01:10	Mannit	0.18	1.76
		Arabinose	1.28	12.80
		Glukose	41.76	417.57

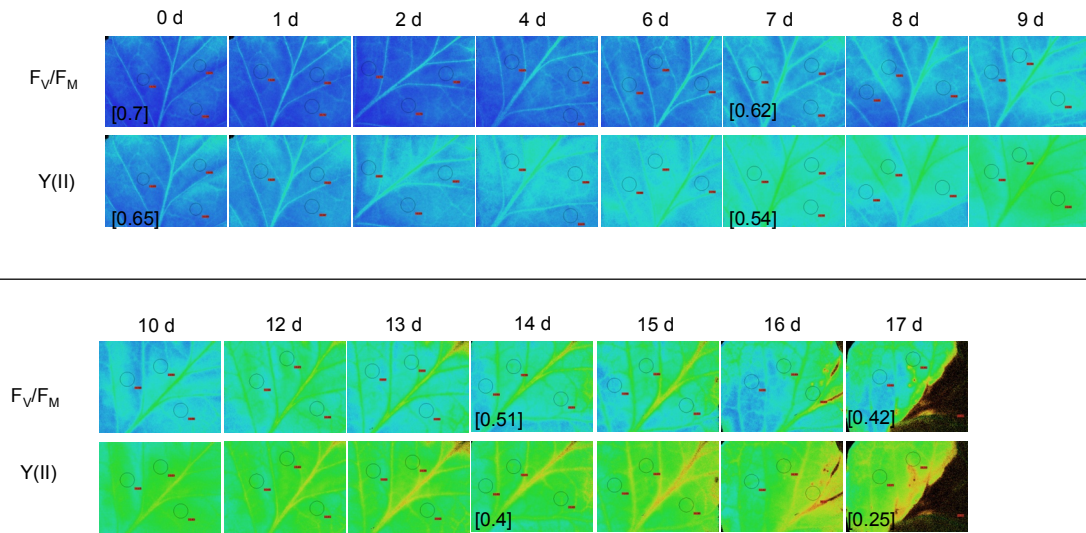
Tabelle der mittels Pulsed Amperometric Detection ermittelten Konzentrationen löslicher Zucker im Blattextrakt transplastomer OA13- und OA14-Pflanzen.

Probe	Verdünnung des zur Analyse verwendeten Extrakts	Detektierter Zucker	Gemessene Zuckerkonzentration in der Probe [ $\mu\text{M}$ ]	Berechnete Zuckerkonzentration im Rohextrakt [ $\mu\text{M}$ ]
OA13#2	01:10	Mannit	3.06	30.61
		Arabinose	0.24	2.41
		Glukose	43.77	437.73
		Fruktose	64.36	643.64
		Saccharose	12.35	123.48
OA13#3	01:10	Mannit	1.93	19.34
		Glukose	27.79	277.88
		Fruktose	35.16	351.62
		Saccharose	6.25	62.45
OA13#4	01:10	Mannit	0.25	2.49
		Arabinose	0.31	3.08
		Glukose	56.30	563.00
		Fruktose	29.62	296.18
		Saccharose	46.05	460.51
OA14#1	01:10	Glukose	7.28	72.77
		Fruktose	1.44	14.36
		Saccharose	0.81	8.06
OA14#2	01:10	Mannit	1.40	13.99
		Arabinose	1.42	14.22
		Glukose	15.34	153.41
		Fruktose	10.28	102.79
		Saccharose	1.63	16.28

Tabelle der mittels Pulsed Amperometric Detection ermittelten Konzentrationen löslicher Zucker im Blattextrakt transplastomer OT12- und OT13-Pflanzen.

Probe	Verdünnung des zur Analyse verwendeten Extrakts	Detektierter Zucker	Gemessene Zuckerkonzentration in der Probe [ $\mu\text{M}$ ]	Berechnete Zuckerkonzentration im Rohextrakt [ $\mu\text{M}$ ]
OT12#1	01:10	Mannit	1.90	18.95
		Arabinose	1.88	18.81
		Saccharose	65.00	650.04
OT12#2	01:10	Mannit	0.32	3.17
		Arabinose	0.58	5.83
		Glukose	123.77	1237.71
		Fruktose	179.01	1790.06
OT12#3	01:10	Saccharose	37.16	371.56
		Mannit	0.35	3.52
		Arabinose	1.26	12.60
		Saccharose	58.74	587.36
OT13#1	01:10	Mannit	2.49	24.90
		Arabinose	0.49	4.90
		Saccharose	136.42	1364.16
OT13#2	01:10	Mannit	6.71	67.10
		Arabinose	0.59	5.90
		Saccharose	150.52	1505.19
OT13#3	01:10	Mannit	2.51	25.07
		Arabinose	0.56	5.62
		Saccharose	161.90	1618.98





Abbildungen zur Chlorophyllfluoreszenzmessung mittels PAM-Fluorometer einer OA13-Pflanze mit Angabe der maximalen Quantenausbeute ( $F_V/F_M$ ; jeweils obere Bildreihe) und der relativen Quantenausbeute ( $Y(II)$ ; jeweils untere Bildreihe). Die Zeitangabe der Messung nach dem Umsetzen der Pflanze auf Erde ist in Tagen (d) jeweils über den entsprechenden Messungsergebnissen angegeben. Die Bestimmung von  $F_V/F_M$  und  $Y(II)$  erfolgte an drei zwischen den Blattadern des Blattes gewählt Bereichen, die mit einem Kreis in der Abbildung markiert sind. Zur Angabe der durchschnittlichen Werte von  $F_V/F_M$  und  $Y(II)$  pro Tag erfolgte die Mittelung der für die drei markierten Bereiche erzielten Werte. Die ermittelten Durchschnittswerte für die Tage 0, 7, 14 und 17 sind in Klammern in der jeweiligen Abbildung angegeben.

Tabelle zur Bestimmung des Nikotingehalts gepfropfter und nicht gepfropfter Pflanzen von *Nicotiana tabacum* mittels GC-MS-Analyse. Die Berechnung erfolgte anhand der mittels Massenspektrometrie ermittelten Fläche von Nikotin im Vergleich zur Fläche von 500 ng des internen Standards D4-Nikotin und des Response-Faktors 1.174.

Probe	Einwaage [mg TG]	Nikotin Area	D4-Nikotin Area	Konzentration Nikotin [µg/g TG]
WT1	24.9	212214741	1686919	2965.65
WT2	14.5	23663680	184363	5196.11
WT3	14.6	14010699	128538	4382.42
OA1	15.7	88561891	706269	4688.30
OA2	14.9	10453669	115856	3554.69
OA3	15.3	23435470	176884	5083.14
WT1 Pfropf	100.6	23291367	616806	220.34
WT2 Pfropf	100.4	694108	318629	12.74
WT3 Pfropf	100.6	39795431	1355511	171.31
WT4 Pfropf	99.8	636936	275962	13.58
OA1 Pfropf	99.5	1459060	704010	12.23
OA2 Pfropf	100.8	20017707	5314942	21.93
OA3 Pfropf	100.1	943418	205595	26.91
OA4 Pfropf	100.3	43174896	1785278	141.53
OA7 Pfropf	100.8	635899	399621	9.27
OA8 Pfropf	99.9	58333006	2219803	154.41

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha danke ich für Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Projekts, die Betreuung, Geduld und Hilfe und dem steten Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein Dank gilt außerdem meinen Laborkollegen Suse, Simone und Christine für den angenehmen Laboralltag. Besonders möchte ich auch den Mitarbeitern der AG Thiel für die stete Hilfsbereitschaft bei Fragen, Problemen und Pufferengpässen sowie für die Mitbenutzung von Laborgeräten danken. Ebenso möchte ich allen Wissenschaftlern danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, indem sie Versuchsdaten beigesteuert oder sich an der Auswertung der Daten beteiligt haben, insbesondere Katharina Bonfig, Markus Krischke, Eva Wirth und der Familie Reinders.

Prof. Markus Simon und Prof. Sam Telford danke ich für die Durchführung der Fütterungsexperimente.

Dank gebührt allen, die neben der Universität direkt oder indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben, besonders Robert und Christine für Tipps und Korrektur.

Danke auch an Helmut für die endlose Geduld.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie Andrea, Klaus, Elke, Oma und Opa. Danke, dass ihr immer für mich da seid, für eure Liebe und Unterstützung!

## Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden

### Publikationsliste

**Hennig A., Bonfig K., Roitsch T., Warzecha H.**(2007):Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. *FEBS Journal* 274(21):5749-58

**Hennig A., Reinders Y., Giritch A., Reinders J., Warzecha H.** (2008): Assessment of different expression strategies for production of a recombinant lipoprotein vaccine in plants. *The Open Biotechnology Journal* 2:51-55

**Warzecha H. & Hennig A.** (2010): Plastid Transformation, in: Genetic Modification of Plants; Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 64 Kempken F., Jung C. (Eds.) ISBN: 978-3-642-02930-3

### Beiträge zu Tagungsbänden

**Hennig A. & Warzecha H.** (2007): Lipoprotein-vaccines from transplastomic plants. Posterpräsentation, zweite internationale Konferenz "Plant-Based Vaccines and Antibodies", Verona, Italien.

**Hennig A. & Warzecha H.** (2008): Lipoprotein-vaccines from transplastomic plants. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Bonn.

**Hennig A.** (2010): Stability of recombinant proteins in tobacco chloroplasts is affected by their N-terminal signal sequences. Vortrag, zweites internationales Symposium "Chloroplast Genomics and Genetic Engineering", Maynooth, Irland.

## Lebenslauf

### Anna Carina Hennig

Geburtsdatum: 03.03.1982  
Geburtsort: Würzburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Hochschulstudium/Promotionsstudium

---

09 2007 – 06 2010	Fortsetzung der Promotion an der Technischen Universität Darmstadt
09 2006 – 09 2007	Beginn der Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10 2001 – 08 2006	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg Abschluss: Diplom Biologin Univ.

### Schulische Ausbildung

---

1992 – 2001	Mozart-Gymnasium Würzburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1988 – 1992	Grundschule Aub

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Darmstadt, den 25.02.2011

Anna Carina Hennig